



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

TESIS DOCTORAL:

**REGULACIÓN DEL PROCESO DE  
MIELINIZACIÓN PERIFÉRICA POR FACTORES  
NEUROTROFICOS DE LA FAMILIA DE  
LIGANDOS DE GDNF**

ALEJANDRA MERCEDES MORÁN GONZÁLEZ

MADRID, 2015

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Tesis Doctoral:

**REGULACIÓN DEL PROCESO DE  
MIELINIZACIÓN PERIFÉRICA POR FACTORES  
NEUROTROFICOS DE LA FAMILIA DE  
LIGANDOS DE GDNF**

Presentada por Alejandra Mercedes Morán González, Licenciada en  
Bioanálisis; para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de  
Madrid.

Dirigida por:  
Dr. José Miguel Cosgaya Manrique  
Científico Titular del CSIC

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS “ALBERTO SOLS”



**José Miguel Cosgaya Manrique**

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”

C/ Arturo Duperier, 4

C.P.: 28029

Madrid-España

Tel: (+34) 915854477

Fax: (+34) 915854401

Email: jmcosgaya@iib.uam.es

El Dr. José Miguel Cosgaya Manrique, científico titular del CSIC en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM

**CERTIFICA:**

Que Alejandra M. Morán González, licenciada en Bioanálisis por la Universidad Central de Venezuela y grado académico de licenciatura homologado ante el Ministerio de Educación, ha realizado bajo mi dirección y para la obtención de una Tesis Doctoral el trabajo de investigación titulado:

**“REGULACIÓN DEL PROCESO DE MIELINIZACIÓN PERIFÉRICA  
POR FACTORES  
NEUROTROFICOS DE LA FAMILIA DE LIGANDOS DE GDNF”**

**CONSIDERA:**

Que, tanto el trabajo experimental como las conclusiones del mismo reúnen las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Y, para que conste a todos los efectos oportunos, firma el presente certificado en Madrid, a 05 de Octubre de 2015.

Fdo: Dr. José Miguel Cosgaya Manrique  
Director de la Tesis Doctoral  
Científico titular del CSIC  
IIBM “Alberto Sols”

Esta memoria se ha realizado bajo la dirección del Dr. José Miguel Cosgaya Manrique;  
en el Departamento de Fisiopatología Endocrina y del Sistema Nervioso del Instituto de  
Investigación Biomédicas de Madrid "Alberto Sols" (CSIC-UAM).

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a una beca predoctoral de  
La Fundación Gran Mariscal de Ayacucho (Fundayacucho), de Venezuela.





A mis padres Dixon y Milagros  
hermanos y abuelos y  
mi esposo Sergio



<sup>12</sup> Y junto al río, en la ribera, a uno y otro lado, crecerá toda clase de árboles frutales; sus hojas nunca caerán, ni faltará su fruto. A su tiempo madurará, porque sus aguas salen del santuario; y su fruto será para comer, y su hoja para medicina.

Ezequiel 47:12



# AGRADECIMIENTOS

En este capítulo del trabajo se hablará sobre la importancia y participación de diferentes componentes, miembros y personas que de una manera u otra se han visto implicadas en un camino que comencé hace unos cuantos años cuando pisé por primera vez el IIB (mi casa científica) y que tiene como capítulo final este proyecto.

## A quienes me motivaron:

Muchas son las personas que me han acompañado en este trayecto, algunas ya se transformaron en otro tipo de energía (ley de conservación de la materia) y en este caso hago referencia a mi dulce abuela Josefina, una hermosa mujer que me dio impulso y razones para interesarme por el sistema nervioso en forma de Parkinson; a ella, nunca supe entender la magnitud de su dolor.

Este párrafo va en inglés. Goes for a very important person name Pål who became my first encounter with this beautiful, but intriguing and yet sad part of neuroscience in the way of Multiple Sclerosis. To and for you my little input with this research. One day you'll be better.

Falta mencionar a mi abuela Olga, hermosa y robusta mujer que durante la realización de mis estudios predoctorales fue mi tercer y desagradable encuentro con las enfermedades neurodegenerativas en forma de Alzheimer; se fuerte abu.

Estas tres personas son pilares fundamentales y causales de las páginas aquí escritas y mi deseo de que mejoren las cosas para todas las familias que viven con enfermedades de este tipo; a ellas el mayor de los agradecimientos y bendiciones.

## Este agradecimiento a continuación lo considero el más importante y menos agradecido en los estudios científicos:

A todos los pequeños roedores Wistar que han generado con su vida las conclusiones de este trabajo. Que sus vidas no sean en vano. Todo el respeto del mundo para ustedes, hermosas criaturitas.

## A mi familia:

Mima y Mimo, mis padres. Sin ustedes la vida no es igual; sin su amor, perseverancia y fé en mí no sería quién soy. Gracias por levantarme tras cada caída, por apoyarme siempre en mis locuras y mis sueños y nunca dejar de creer en mí. Para ustedes no hay palabras en el mundo que describan la gratitud que les tengo y además son mi mayor inspiración en la vida, el modelo a seguir de amor al prójimo y la familia. Gracias por enseñarme el concepto de bondad y fé. Mis hermanos Mano, BB y Bro. Gracias por las largas conversaciones, por crecer conmigo por las peleas y el amor incondicional. Juntos hemos aprendido convivencia, amor, cooperación y han sido mis grandes amores. Espero que sepan que por ustedes lo doy todo. Abuela Angelica, gracias por cuidarme siempre, por tus llamadas y tu cariño incondicional. Haz sido un gran apoyo emocional para mí durante todo este tiempo, te quiero y agradezco mucho, espero que la vida nos permita volver a vernos. A mi nueva familia Tere y Pedro; maravillosas personas que me han acogido con todo su amor y respeto y mis 3 cuñis, por ser geniales. A mis sobris, no sabía que se quería tanto a unas minipersonas como les quiero a ustedes.

Y este párrafo para mi Cielo, Sergio Villa; ¡el amor en forma de hombre!. Gracias por tu sonrisa que alegra e ilumina todo, por tu humildad y esa forma impresionante que tienes de quererme a mí y a todos. Tú el mayor descubrimiento que logró esta tesis, de no ser por ella posiblemente

no te hubiese conocido y a mi vida tuviera el vacío que solo tú has sabido llenar. Por último a mi hija Tortuguís, mi pequeño y cariñoso arqueosaurio y Sussy mi siempre cachorrita bella por tanto amor que son capaces de dar con la mirada.

#### A mis amigos:

Los venezolanos que aunque no están cerca en físico pero durante estos años me han demostrado que con la tecnología y el querer estar (Blackberry messenger, Skype, FaceTime y Wassup) se acortan las distancias y las barreras no existen. Gracias en especial a mis hermanasas (Mary, Lis e Yli) por más de 20 años de amistad. Al Grupete (Mary, Lage, Vicky, etc) por ser apoyarme, visitarme y ser mis colegas (de los que estoy muy orgullosa por sus logros) y amigos. Otras personas importantes; mi Angy, otra migui con la que pasé temperaturas extremas, las experiencias y descubrí lo que es estar en un país que no es el tuyo, extrañando a tu familia y lo mismo para Gaby. Para Lula, la mejor amiga de todas y claro como no resaltar que me enseñaste a que las amistades no son circunstanciales y que nosotras podemos vivir una en Australia y la otra en España pero sabiendo siempre que hace la otra, apoyando en momentos duros y alegrándonos por las felicidades de la vida, supongo que lo sabes pero lo repito, te quiero un montón.

Los españoles (o que conocí en el doctorado) por las risas, las tardes visitando sitios de comida de otros países, los viajes, las aventuras y el cuidarme los geles que ya vengo. Gracias Mario (hermanito de labo) por la compañía y la complicidad. Antonio, como no recordarte a ti y acordarme de la RAE; gracias por las risas, la amistad y el Gangnam. Anita Cañadas, mi pequeño gran saltamontes, mi primera amiguita de labo, gracias por las madrugadas de migraciones y todo lo demás. A Dany, Alvaro, Rafa, Ana, Eva, Mirigu y Gelju y el resto por las salidas, las historias y las charlas del almuerzo (llenos de diversión y ocurrencias).

#### A mi director y asociados

Gracias José Miguel Cosgaya por confiar en mí, por enseñarme todo lo que he aprendido durante estos años acerca de la formación de mielina, por ser más que un director de tesis y junto a Josune los guías de laboratorio de Mario y míos. Por las tardes de enseñanza y aprendizaje, por los chocolates de los viajes y el otro estómago del helado.

En este apartado a los amigos jefes Ana Mary (la mejor), Olivier (paciencia de acero), Borja (la alegría) y Josune de nuevo (te tengo un cariño especial).

A Teresa Iglesias, por su labor como tutor de esta memoria.

Gracias Ana (Secretaría Bioquímica) por tanta paciencia siempre que pedía un certificado de estudios para la beca. Diego y Carlos (IIB) por abrirnos cuando no teníamos tarjeta, por la compañía los fines de semana de experimentos y a los miembros de mi iglesia.

A Venezuela por formarme como Bioanalista y brindarme una beca predoctoral para crecer para ti. A España por recibirme y colaborar con mi formación para ser mejor profesional y persona.

Gracias al IIB, UAM y Fundayacucho/Fonacit.

¡Gracias Totales!

AleMorán

## RESUMEN

La envuelta de mielina es un componente especializado del sistema nervioso cuya función principal es la de maximizar la eficacia y velocidad de la transmisión del impulso nervioso. Debido a su implicación en diversas neuropatías, se ha generado un gran interés en dilucidar los mecanismos de regulación del proceso de formación de mielina. La mielinización es uno de los ejemplos más exquisitos de interrelación celular en el que los dos tipos celulares implicados (la neurona y la célula de la glía, la célula de Schwann [SC] en el sistema nervioso periférico) han de coordinarse tanto en el espacio como en el tiempo para llevar a buen puerto este proceso. La mielinización se desarrolla gracias al despliegue de un programa genético intrínseco de la célula de Schwann que, a su vez, se encuentra bajo el estricto control de diversos factores extrínsecos y del ambiente. Aunque en los últimos años se ha conseguido avanzar significativamente en el conocimiento de este proceso, gran parte de la naturaleza de las distintas señales axón/glía que promueven la iniciación del proceso de mielinización y que regulan la velocidad y el alcance de la formación de mielina no han sido todavía totalmente caracterizados.

Una imagen emergente es que los principales agentes responsables de la regulación de la mielinización son factores previamente caracterizados por su actividad neurotrófica, entre los que se destacan especialmente las neurotrofinas. Aparte de esta familia, el principal grupo de agentes polipeptídicos con actividad neurotrófica es el constituido por los ligandos de la familia del GDNF (GFLs), por lo que nos propusimos analizar si, de forma equivalente, estos factores también podrían estar participando en la regulación del proceso de mielinización periférica.

Nuestros datos demuestran que tanto los distintos ligandos (GDNF, NRTN, ARTN y PSPN), como sus co-receptores específicos (GFR $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 y  $\alpha$ 4, respectivamente) y los receptores de señalización Ret y NCAM se encuentran presentes durante las etapas claves del desarrollo del nervio ciático (utilizado como modelo de mielinización in vivo), así como que sus niveles relativos de expresión se regulan de forma diferencial. El uso in vitro de cultivos purificados de SCs o de neuronas sensoriales procedentes de ganglio raquídeo junto con el establecimiento de cocultivos mielinizantes, nos ha permitido discernir que los distintos receptores y co-receptores se expresan en ambos tipos celulares, con la salvedad de GFR $\alpha$ 4 que sólo se expresa en SCs y de Ret, que es exclusivamente neuronal.

Mediante el uso de dichos cocultivos mielinizantes, hemos podido demostrar que todos los GFLs son capaces de regular los aspectos iniciales del proceso de mielinización produciendo un marcado aumento en el recubrimiento axonal por SCs. Al contrario, sólo GDNF, NRTN y PSPN son capaces de producir incrementos en la cantidad de mielina madura obtenida en su presencia. Los mecanismos de señalización utilizados por GDNF y PSPN son altamente complejos y, en el caso de GDNF, incluyen la acción positiva de la señalización en la neurona vía Ret (no así en el caso de PSPN), mientras que ambos factores comparten una segunda ruta de señalización vía NCAM, que presumiblemente actúa en la SC. La señalización vía GFL/GFR $\alpha$ -NCAM implica, al menos, la activación de dos rutas de señalización intracelular con efectos contrapuestos. Por un lado, su acoplamiento a FGFR media la aparición de un mecanismo anti-mielinogénico, mientras que el acoplamiento a la ruta mediada por la quinasa Fyn es la principal responsable de los efectos pro-mielinogénicos de ambos GFLs.

Finalmente, GDNF y PSPN también participan en otros aspectos de la fisiología de la SC, regulando su capacidad migratoria por un mecanismo en el que no parecen estar implicados FGFR, CaMKII o Fyn.

Estos resultados nos permiten sugerir que los GFLs podrían colaborar en el desarrollo y mantenimiento de la integridad de la envuelta de mielina, y que podrían ser de utilidad como agentes terapéuticos en neuropatías periféricas que cursan con procesos de desmielinización.





## **ABSTRACT**

The myelin sheath is a specialized component of the nervous system, whose main function is to maximize the efficiency and speed of the action potentials in neurons. Due to its implication on several neuropathies, a great interest has emerged trying to decipher the regulatory mechanisms of the myelin formation process. Myelination is one of the most exquisite examples of cell-to-cell interrelationship in which the two cell types implicated (neurons and glial cells, Schwann cells [SC] in the peripheral nervous system) have to coordinate themselves both in time and space to succeed. The myelination process develops thanks to the deployment of an intrinsic genetic program in the glial cell that, by itself, is also under the strict control of several environmental and extrinsic factors. Although in the last years a great deal of new knowledge about myelin formation has been achieved, most of the nature of the diverse axon/glia signals that promote the initiation of the myelination process and that regulate the speed and extent of myelin formation have not been fully characterized yet.

An emerging picture is that the major myelination regulators are factors previously characterized by their neurotrophic activity and, among them, the neurotrophins stands out prominently. Besides this family, the major group of polypeptidic factors with neurotrophic activity is constituted by the GDNF family of ligands (GFLs). For that reason, we decided to analyze if, in a similar fashion, these factors could also be participating in the regulation of the peripheral myelination process. Our data demonstrate that all the ligands (GDNF, NRTN, ARTN and PSPN), their specific co-receptors (GFR $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 4, respectively) as well as the signaling receptors Ret and NCAM are expressed during the key developmental stages of the sciatic nerve (used as an *in vivo* myelination model), and that their relative levels are differentially regulated. By using *in vitro* purified cultures of SCs or DRG sensory neurons, together with the establishment of myelinating cocultures, we have been able to describe that all the receptors and co-receptors are expressed by both cell types, except GFR $\alpha$ 4 that is expressed only in SCs and the neuron-specific Ret. By using the myelinating cocultures, we have been able to demonstrate that all GFLs are able to regulate the initial stages of the myelination process, inducing a strong increase in axonal ensheathment by SCs. On the other hand, only GDNF, NRTN and PSPN are able to enhance mature myelin production.

The signaling mechanisms engaged by GDNF and PSPN are highly complex and, in the case of GDNF (but not of PSPN) includes the positive activity of neuronal Ret signaling, while both factors share a second signaling pathway via NCAM, presumably acting on the SCs. The signaling via GFL/GFR $\alpha$ -NCAM implies, at least, the activation of two intracellular signaling pathways with disparate effects. On the one hand, the coupling to FGFR mediates the manifestation of an anti-myelinogenic mechanism, while the coupling to a Fyn kinase-mediated pathway is the major responsible of the pro-myelinogenic effects of both GFLs.

Finally, GDNF and PSPN also participate in other physiological aspects of SCs, regulating their migratory capability by a mechanism in which FGFR, CaMKII or Fyn seems not to be implicated. These results allows us to suggest that GFLs could collaborate in the development and maintenance of myelin sheet integrity, and that they could be of potential interest as therapeutical agents in peripheral demyelinating neuropathies.



# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xvi</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>xix</b>
<b>CLAVE DE ABREVIATURAS</b>	<b>xxiii</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b><u>La Mielina</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b>Composición de la Mielina</b>	<b>1</b>
<b>Regulación del Proceso de Mielinización</b>	<b>2</b>
<b>GDNF</b>	<b>5</b>
<b>NRTN</b>	<b>6</b>
<b>ARTN</b>	<b>6</b>
<b>PSPN</b>	<b>6</b>
<b><u>Receptores de GFLs</u></b>	<b><u>7</u></b>
<b>GFR<math>\alpha</math>: Co-receptores específicos</b>	<b>7</b>
<b>Receptores de señalización</b>	<b>8</b>
<u>RET</u>	8
<u>Vía Erk/MAPK</u>	9
<u>Vía PI3K/Akt</u>	10
<u>Otras rutas de señalización</u>	10
<u>NCAM</u>	11
<u>Vía FGFR</u>	12
<u>Vía CaMKII</u>	13
<u>Vía Fyn</u>	13
<b><u>Funciones Fisiológicas de los GFLs en el Desarrollo y</u></b>	
<b><u>Funcionamiento del Sistema Nervioso</u></b>	<b>13</b>
<b><u>Neuronas Simpáticas</u></b>	<b>15</b>
<u>Neuronas Parasimpáticas</u>	16
<u>Neuronas Entéricas</u>	16
<u>Neuronas Sensoriales Somáticas</u>	16
<u>Neuronas Motoras</u>	<u>17</u>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
<b><u>Factores neurotróficos y drogas</u></b>	<b>21</b>
<b><u>Cultivos Celulares</u></b>	<b>21</b>
<b>Medios de Cultivo</b>	<b>21</b>
<u>Medio de Neuronas DRGs / Cocultivos</u>	21
<u>Medio de SCs</u>	21
<b>Pretratamiento de placas</b>	<b>21</b>
<u>Poli-L-Lisina</u>	21
<u>Colágeno</u>	22
<u>Matrigel</u>	<u>22</u>
<u>Fibronectina</u>	<u>22</u>
<u>Laminina</u>	23
<b>Cocultivos mielinizantes de neuronas DRGNs y SCs</b>	<b>23</b>
<b>Cultivos de SCs</b>	<b>24</b>
<b>Cocultivos mielinizantes en medio NB</b>	<b>24</b>

<b>Análisis de las Muestras</b>	<b>25</b>
<b>Cuantitativa a Tiempo Real</b>	<b>25</b>
Reacción qPCR	25
<b>Inmunofluorescencia</b>	<b>26</b>
<u>Soluciones y Anticuerpos</u>	26
<u>Tampones</u>	26
<u>Anticuerpos primarios</u>	26
<u>Anticuerpos secundarios</u>	27
<u>Análisis por Inmunofluorescencia</u>	27
<u>Determinación del Índice de Mielina</u>	27
<b>Ensayos de Migración</b>	<b>27</b>
<b>Ensayos de Proliferación (Cristal Violeta)</b>	<b>28</b>
<b>Análisis de datos y procedimientos estadísticos</b>	<b>28</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>29</b>
<b>Niveles de expresión de GFLs, co-receptores y receptores de GFLs <i>in vivo</i></b>	<b>29</b>
<b>Expresión de GFLs, receptores y co-receptores en nervio ciático</b>	<b>29</b>
<b>Curso temporal de expresión de GFLs durante el desarrollo del nervio ciático</b>	<b>30</b>
<b>Niveles de expresión de co-receptores y receptores de GFLs durante el desarrollo del nervio ciático</b>	<b>31</b>
<b>Expresión de los distintos GFLs, receptores y co-receptores <i>in vitro</i></b>	<b>31</b>
<b><u>Regulación del proceso de mielinización por GFLs</u></b>	<b>33</b>
<b>Incremento del recubrimiento axonal en cocultivos tratados con GFLs</b>	<b>33</b>
<b>Incremento de la formación de internodos de mielina en cocultivos tratados con GFLs</b>	<b>33</b>
<b>El pretratamiento de cocultivos con GDNF y PSPN aumenta su efecto sobre la mielinización</b>	<b>35</b>
<b>Los efectos de GDNF y PSPN sobre la mielinización <i>in vitro</i> son independientes de sustrato</b>	<b>37</b>
<b>Efectos de GFLs en la Formación de Mielina en Cocultivos Mantenidos en Medio Neurobasal</b>	<b>40</b>
<u>Incremento de la formación de internodos de mielina en ausencia de NGF y suero</u>	40
<u>Efecto del suero sobre la formación de mielina en ausencia de NGF</u>	41
<b><u>Rutas de transición de señales implicadas en la modulación de la mielinización por GFLs</u></b>	<b>42</b>
<b>Participación del receptor Ret en la señalización por GDNF y PSPN</b>	<b>42</b>
<b>Participación del receptor NCAM en la señalización por GDNF y PSPN</b>	<b>44</b>
<u>Participación de NCAM en la señalización por GFLs:</u>	
<u>Implicación de FGFR</u>	44
<u>Participación de NCAM en la señalización por GFLs:</u>	
<u>Implicación de CaMKII</u>	44
<u>Participación de NCAM en la señalización por GFLs:</u>	
<u>Implicación de Fyn</u>	47
<b><u>Regulación de la migración de células de Schwann por GFLs</u></b>	<b>48</b>
<b>NRTN y ARTN no modulan la migración de las células de Schwann</b>	<b>48</b>

<b>GDNF y PSPN modulan la migración de las células de Schwann</b>	<b>48</b>
<b>Los GFLs no influyen en la proliferación de las SCs</b>	<b>49</b>
<b><u>Efectos de los Inhibidores de Señalización de NCAM en la migración de SCs</u></b>	<b>50</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>
<b><u>Expresión de GFLs y sus receptores durante el desarrollo del nervio periférico</u></b>	<b>53</b>
<b><u>Regulación del proceso de mielinización por GFLs</u></b>	<b>55</b>
<b><u>Independencia de sustrato en la regulación de la mielinización por GFLs</u></b>	<b>57</b>
<b><u>GDNF y PSPN modulan la formación de mielina independiente de NGF</u></b>	<b>57</b>
<b><u>Implicación de GFLs-Ret en la regulación del proceso de mielinización periférica</u></b>	<b>58</b>
<b><u>Implicación de GFLs-NCAM en la regulación de la mielinización periférica</u></b>	<b>58</b>
<b><u>Mecanismos de regulación de la mielinización periférica por GFLs</u></b>	<b>60</b>
<b><u>Regulación de la migración de las SCs por GFLs</u></b>	<b>62</b>
<b><u>Implicaciones Fisiopatológicas</u></b>	<b>62</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>67</b>
<b>ARTÍCULO</b>	<b>79</b>



## CLAVE DE ABREVIATURAS

### **A**

**Akt:** Oncogén aislado de tumores producidos por el retrovirus murino AKT8.

**AKT:** Proteína quinasa B.

**Arf:** Factor de ribosilación de ADP.

**ARTN:** Artemina.

### **B**

**BDNF:** Factor neurotrófico derivado del cerebro.

### **C**

**CAM-L1:** Proteína de adhesión celular L1.

**CaMKII:** Calcio calmodulina quinasa II.

**cAMP:** Adenosina-3',5'-monofosfato cíclico.

**Cbl:** Linfoma Casitas de linaje B.

**CMT:** Charcot-Marie-Tooth.

**CNS:** Sistema nervioso central.

### **D**

**DAG:** Diacilglicerol.

**DRG:** Ganglio raquídeo de raíz dorsal.

**DRGN:** Neuronas de ganglio de raíz dorsal.

### **E**

**ECM:** Matriz extracelular.

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico.

**EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

**EGR2:** Proteína de respuesta a crecimiento temprano 2.

**ENS:** Sistema nervioso entérico.

**EPAC:** Proteína de intercambio activada directamente por cAMP.

**ERK:** Proteína quinasa regulada por señales extracelulares.

### **F**

**FAK:** Quinasa de adhesión focal.

**FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos.

**FGFR:** Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos.

**FRS-2 $\alpha$ :** Substrato 2 $\alpha$  de FGFR.

**FRS2:** Sustrato 2 del factor de crecimiento de fibroblastos.

**Fyn:** Proto-oncogen tirosina quinasa de la familia Src.

### **G**

**GAP:** Proteína activadora de GTPasas.

**GBS:** Síndrome de Guillain-Barré.

**GDNF:** Factor neurotrófico derivado de la glia.

**tGuanosín difosfato.**

**GEF:** Proteína intercambiadora de nucleótidos de Guanosina.

**GFL:** Familia de ligandos del factor neurotrófico derivado de la glia.

**GFR:** Receptor de factores de GDNF.

**GPI:** Anclaje de proteínas Glicosilfosfatidilinositol.

**Gpr126:** Receptor acoplado a proteína G 126.

**GRB2:** Factor de crecimiento unido al receptor de proteína 2.

### **K**

**KN62:** Inhibidor de CAM quinasa II

### **M**

**MAG:** Glicoproteína asociada a mielina.

**MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógenos.

**MBP:** Proteína básica de mielina.

**MEN:** Neoplasia endocrina múltiple.

**MEN2B:** MEN de tipo 2B.

**miRNA:** Micro ácido ribonucleico.

**mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero.

### **N**

**NCAM:** Molécula de adhesión celular neuronal.

**NF- $\beta$ :** Factor de necrosis beta.

**NF- $\kappa$ B:** Factor Nuclear  $\kappa$ B.

**NGF:** Factor de crecimiento nervioso.

**NMJ:** Unión Neuromuscular.

**NRG:** Neuregulina.

**NRTN:** Neurturina.

**NT-3:** Neurotrofina-3.

## **P**

**P0:** Proteína de mielina cero.

**p75:** Receptor de neurotrofinas p75.

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

**PI3K:** Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa.

**PIP2:** Fosfatidilinositol 4,5-difosfato.

**PIP3:** Fosfatidilinositol 4,5-trifosfato.

**PKA:** Proteína quinasa A.

**PKB:** Proteína quinasa B.

**PLC:** Fosfolipasa C.

**PMP22:** Proteína de mielina periférica 22.

**PNS:** Sistema nervioso periférico.

**PP2:** Inhibidor de SLKs.

**PrPc:** Proteína celular priónica.

**PSA:** Ácido polisialico.

**PSPN:** Persefina.

## **R**

**RA:** Ácido retinoico.

**Raf:** Factor activado por Ras.

**RAR:** Receptor de ácido retinoico.

**RAS:** Proteína con actividad reguladora GTP-hidrolasa (deriva de las secuencias de nucleótidos mutadas encontradas en sarcomas de rata inducidos por retro-virus).

**RET:** Reorganizado durante la Transfección.

**RPTP $\alpha$ :** Familia  $\alpha$  de receptores de la proteína tirosina fosfatasa.

**RTK:** Receptor tirosina quinasa de superficie.

**RXR:** Receptor X de retinoides.

## **S**

**SCG:** Ganglio cervical superior.

**SCGN:** Neurona simpática de los ganglios cervicales superiores.

**SC:** Célula de Schwann.

**Shc:** Proteína que contiene dominios de homología a Src (pueden ser tipo 2 o 3).

**SLK:** familia de quinasas parecidas a Src.

**SNpc:** Substancia negra par compacta.

**SOS:** Hijo de sevenless (sevenless es una mutación en Drosophila que produce la falta de la séptima célula visual).

**Src:** Proto-oncogen derivado del virus sarcoma de Rous (aves), es una proteína tirosina quinasa citosólica Src.

**SU5402:** Inhibidor de la vía FGFR1.

## **T**

**TA:** Temperatura ambiente.

**TAG-1:** Glicoproteína axonal transitoria 1.

**TG:** Trigémino.

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$ .

**TrK:** Quinasa relacionada con tropomiosina.

**TrKA:** Receptor tirosina quinasa para NGF.

**TrKB:** Receptor tirosina quinasa para BDNF y NT-4.

**TrKC:** Receptor tirosina quinasa para NT-3.

**TVA:** Área tegmental ventral.

## **V**

**VDCC:** Canal de calcio voltaje-dependiente.



# INTRODUCCIÓN

## La Mielina

La envuelta de mielina es una especialización característica del sistema nervioso formada a partir de la membrana celular de las células de glía, células de Schwann (SCs) en el sistema nervioso periférico y oligodendrocitos en el sistema nervioso central, que da lugar a la formación de una capa aislante alrededor de los axones que recubre.

Su propósito principal es optimizar la transmisión del impulso nervioso. En los axones de los nervios mielinizados, generalmente aquellos que presentan un diámetro superior a  $1\ \mu\text{m}$ , los canales iónicos responsables de la transmisión del impulso nervioso se encuentran concentrados en los nodos de Ranvier, que se encuentran separados por segmentos de mielina que actúan de forma similar a la del aislamiento alrededor de un cable eléctrico, dando lugar a la aparición de la “conducción saltatoria”. Ello hace que el impulso nervioso no sólo vaya más rápido sino que también sea más eficiente, requiriendo menos energía y espacio. Para alcanzar una velocidad similar, un axón amielínico debería tener un diámetro 40 veces mayor y consumir 5000 veces más energía. Aparte de la optimización del impulso nervioso, su presencia es esencial para la supervivencia y el soporte trófico de los axones a los que rodea.

El papel crucial de la mielina en el correcto funcionamiento del sistema nervioso queda evidenciado por los devastadores efectos que supone su pérdida o mal funcionamiento, tanto en el SNP en enfermedades como el síndrome de Guillain-Barré (GBS) [183] que afecta a una-dos personas de cada 100.000 o la mucho más común enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) [15] que afecta a una

de cada 3.500 personas, como en el SNC en enfermedades como la esclerosis múltiple que es padecida aproximadamente por una de cada 1.000 personas.

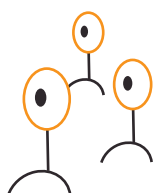
## Composición de la Mielina

La composición de la mielina varía entre el sistema nervioso periférico y central, principalmente por las proteínas presentes en la bicapa lipídica de las envueltas de mielina. La mutación, delección o sobreexpresión de estas proteínas son la causa principal de las mielinopatías periféricas, especialmente en la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth [106].

La vaina de mielina presenta dos formas estructurales definidas, una mielina compacta y otra no compacta, con una marcada distribución de proteínas diferenciadas.

La mielina compacta forma la mayor parte del internodo y de su composición proteica destaca la proteína de mielina cero (P0), que representa hasta el 60% del peso seco de la mielina, siendo la principal responsable de dicha compactación; otro componente fundamental de estas regiones compactas es la proteína básica de mielina (MBP), de carácter citoplasmático, que forma gran parte de la línea densa mayor; también se encuentra la proteína de mielina periférica 22 (PMP22), proteína hidrofóbica de membrana poco abundante cuya función se desconoce; aunque su cantidad es crítica en la mielina periférica, como lo demuestra el hecho de que las principales neuropatías hereditarias están causadas por repeticiones, delecciones o mutaciones de su gen [10].

La mielina no compacta está presente en las regiones laterales de las vainas de mielina o paranodales y en las interrupciones a lo largo de la mielina compacta, las incisuras de Schmidt-Lanterman. En estas áreas destaca la presencia



de la glicoproteína asociada a mielina (MAG), que se encuentra en grandes cantidades en las superficies apicales/adaxonales [10].

### **Regulación del Proceso de Mielinización**

El proceso de formación de mielina a nivel periférico requiere de una afinada coordinación entre los dos tipos celulares implicados, las SCs y las neuronas; proceso que es mediado por interacciones glía-neurona que controlan las diferentes etapas de formación de mielina. Estas interacciones implican la presencia de procesos de señalización en el cual participan diversos factores hormonales, de crecimiento y neurotróficos.

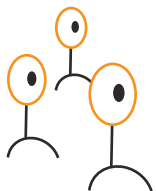
Como se ha indicado previamente, uno de los principales exponentes de interacción célula-célula es el proceso de mielinización, que ha de entenderse como un proceso continuo en el desarrollo que se inicia con la generación y migración de los precursores gliales, pasa por su diferenciación, y que culmina en la formación de la envuelta de mielina madura como tal. Durante la maduración de los nervios las SCs provenientes de la cresta neural van a migrar a lo largo de los haces de axones desnudos, proliferando y segregándolos hasta que gradualmente se establece una relación 1:1 entre SCs y axones. En este punto, las SCs van a ir extendiéndose lateralmente a lo largo del axón a la vez que sintetizan la lámina basal en su superficie, estructura que rodea a toda la fibra nerviosa, para finalmente formar la envuelta de mielina propiamente dicha. Por parte de la SC, este mecanismo se haya bajo el control de un programa genético intrínseco que coordina la expresión y localización de las diferentes proteínas necesarias para formar la envuelta de mielina como tal. Este programa está gobernado por una red de factores de transcripción, cuyas acciones concertadas regulan la expresión de

las proteínas de mielina, así como la ejecución del proceso en su totalidad [127, 158]. Dentro de esta cascada de factores de transcripción, destaca especialmente Krox20/EGR2, que es capaz de integrar distintas señales y que regula directamente la expresión de las principales proteínas de mielina. Sobre ello se asienta un segundo nivel de regulación a nivel de modificaciones epigenéticas, que regula tanto la transcripción génica mediante modificación (fundamentalmente acetilación) de la cromatina, como la vida media de mRNA y su traducibilidad a través de una red de miRNAs. De hecho, en ausencia de regulación por miRNAs, obtenida mediante la ablación genética de Dicer en SCs, la mielinización periférica no puede proceder con normalidad, originándose nervios totalmente amielínicos [127].

Este proceso se haya bajo el control de toda una serie de factores extrínsecos e indicaciones del entorno, esencialmente producidos por la señalización local mediada por contactos célula-célula y célula-matriz extracelular, así como por la presencia de señales instructivas del axón, todo ello dentro de una señalización más sistémica proveniente del organismo [127].

El contacto axonal constituye una parte integral que regula todo el proceso [53], siendo esencial para la expresión continuada de los genes de mielina y el mantenimiento del fenotipo mielinizante [59].

Otros reguladores importantes son las neu-regulinas (NRGs), proteínas señalizadoras que intervienen en las interacciones célula-célula en el sistema nervioso, el corazón, las glándulas mamarias y otros órganos [52]. Las primeras NRGs aisladas estaban codificadas por el mismo gen, que ahora se conoce como

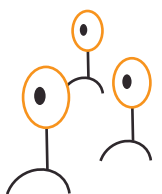


NRG1. Seguidamente a la identificación de este gen, se descubrieron otros tres genes, NRG2, 3 y 4, que codificaban para proteínas relacionadas de cuyas funciones todavía se conoce poco [52]. La familia de proteínas de NRG1 presenta homología con la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y actúa a través de receptores tipo tirosina quinasa de la familia EGFR [1], habiendo demostrado jugar un papel importante en la regulación del proceso de mielinización periférica, como indicadores del grosor final de la mielina [23, 36]. Entre los procesos en los que participan NRG1 se incluyen: el desarrollo de las placas motoras terminales (NRGs de tipo I), la migración de interneuronas (NRGs de tipo II), el inicio y control de la mielinización (NRGs de tipo III), así como la sinaptogénesis y la plasticidad sináptica en el sistema nervioso central [52, 115]. Durante el desarrollo embrionario, existe una fase en la que las SCs son dependientes de la NRG1 derivada de los axones para su supervivencia y crecimiento. Esta fase coincide con la transición que sufren las células de la cresta neural hacia precursores de las SCs, y termina con la diferenciación de estos precursores hacia SCs maduras de fenotipo mielinizante o no [82]. Las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ , tienen funciones distintas en el sistema nervioso periférico.  $\beta$ NRG1 actúa como un potente mitógeno sobre las SCs neonatales de rata, mientras las formas  $\alpha$  no son mitogénicas [135]. Las  $\beta$ NRG1 favorecen la supervivencia de los precursores de SCs en estadio embrionario catorce (E14), mientras las isoformas  $\alpha$  no tienen ningún efecto aparente [44]. Las proteínas NRG1 son indispensables para la supervivencia de las células de Schwann mielinizantes y premyelinizantes en adultos [67, 100, 159]. En el sistema nervioso las NRG1 de tipo I y III son las formas más

abundantes y se producen mayoritariamente en neuronas de proyección, especialmente en motoneuronas espinales y en neuronas de los ganglios raquídeos, pero también se producen, en determinadas circunstancias, en células gliales [136]. La NRG1 no tiene un origen exclusivamente neuronal; sino que las SCs son capaces de sintetizar y liberar NRG1 [135, 141], aunque la función de esta síntesis no está clara, pudiendo estar involucrada en el establecimiento de rutas de señalización autocrinas [30, 141].

Otra de las principales señales originadas en el axón da lugar al incremento en los niveles de cAMP en las SCs. Existen fuertes evidencias del requerimiento de la señalización por cAMP en la SC para que se produzca la iniciación del programa de mielinización [83] mediante un sistema de señalización en el que intervienen proteínas tales como la proteína quinasa A (PKA) y la proteína de intercambio activada directamente por cAMP (EPAC) [11, 79, 181]. Este aumento en los niveles de cAMP se produce por la señalización mediada por el receptor acoplado a proteína G 126 (Gpr126) [64, 111]. Todo lo anterior es apoyado por estudios donde se demuestra que una deficiencia en la expresión de Krox-20 y consecuente disminución en la formación de mielina resultante de la delección de Gpr126 es restituida con el tratamiento con forskolina (un potente agonista de la actividad de la adenilato ciclasa transmembranal) o la sobreexpresión de PKA [64].

Dentro de la señalización proveniente del organismo, un potente modulador de la formación de mielina periférica es el ácido retinoico (RA), el metabolismo activo de la vitamina A, que actúa a través de su unión a receptores nucleares que funcionan como



factores de transcripción dependientes de ligando. La mayoría de los estudios sobre las funciones del RA en el sistema nervioso se ha centrado en su función como morfógeno durante el desarrollo del tubo neural [107] o como un factor diferenciador para distintos tipos neuronales. En nuestro laboratorio se demostró que RA es un potente regulador de la mielinización periférica, actuando a través de dos mecanismos diferentes, primero a través del receptor X de retinoides (RXR), mediante el cual un exceso de RA produce una sobreinducción de Krox-20, lo que origina una sobreexpresión deletérea de P0 y MBP, y, en segundo lugar, inhibiendo la expresión de la proteína señalizadora MAG mediante un mecanismo dependiente del receptor de ácido retinoico (RAR) [98].

Entre los principales factores que están implicados en la regulación del proceso de formación de mielina descritos hasta la fecha, se encuentran en lugar destacado las neurotrofinas, una familia de factores de crecimiento implicados en la supervivencia, crecimiento y diferenciación neuronal que está formada por el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y las neurotrofinas-3 (NT3) y -4/5 (NT4/5).

El NGF fue el primer factor neurotrófico identificado [33] que actúa esencialmente a través de su unión a un receptor tirosina quinasa específico TrkA [89]. El segundo miembro de la familia de las neurotrofinas que se identificó fue el BDNF [99], que comparte el 54% de su secuencia con el NGF y tiene una amplia variedad de funciones en el sistema nervioso. Los efectos del BDNF están mediados principalmente por el receptor tirosina quinasa TrkB. Los otros miembros de la familia son las neurotrofinas, NT-3 y NT-4, cada una de

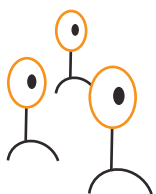
las cuales presenta un patrón específico de unión por los receptores Trk. La NT-3 actúa preferentemente a través del receptor TrkC, mientras la NT-4, al igual que el BDNF, se une a TrkB. Curiosamente, todas las neurotrofinas se unen a un receptor común transmembranal, p75NTR, con una afinidad similar [92].

Así la unión de NGF a su receptor TrkA en las neuronas sensoriales DRG actúa como facilitador de la mielinización periférica por SCs, al mismo tiempo que impide la mielinización de estas neuronas por oligodendrocitos [28]. Sobre esto, se asienta un segundo nivel de regulación. En primer lugar, NT3, a través de su unión a TrkC en las SCs, actúa como un freno a la mielinización [28]. Una vez la señalización de NT3 ha disminuido, BDNF, que es sintetizado por las neuronas, transportado de forma anterógrada por los axones y liberado para poder ser captado por las SCs [117], actúa a través de p75NTR presente en las SCs para influenciar el ritmo e intensidad del proceso de mielinización periférica [34, 164].

Asimismo, las neurotrofinas también son capaces de regular otros aspectos relacionados con el proceso de mielinización, como son la proliferación y migración de las células de Schwann [74].

Una imagen emergente es que muchos de los principales agentes responsables de la regulación de la mielinización son factores previamente caracterizados por su actividad neurotrófica, tales como las neurotrofinas o factores hormonales que actúan a través de su unión a receptores nucleares, como es el caso del RA. Por ello, centramos nuestro interés en otros agentes similares que podrían participar en la regulación de este proceso.

Aparte de las neurotrofinas, el principal grupo de factores neurotróficos capaz de afectar a las



neuronas sensoriales es el constituido por los GFLs, factores de crecimiento pertenecientes a la superfamilia de factores de crecimiento transformantes  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), originalmente identificados como factores tróficos implicados en la supervivencia y diferenciación morfológica de neuronas dopaminérgicas [101]. Ligandos de la familia del GDNF.

Esta familia de factores neurotróficos está formada por cuatro miembros: el factor neurotrófico derivado de glía (GDNF), artemina (ARTN), neurturina (NRTN) y persefina (PSPN). Después de las neurotrofinas, los GFLs están considerados como el principal grupo de factores polipeptídicos con actividad neurotrófica [12, 85, 94, 125, 160, 166, 169]. Los miembros de ésta familia se sintetizan como precursores, pre-proGFLs, siendo secretados y activados por diversos tejidos y uniéndose a receptores específicos en las células diana, produciendo efectos en su desarrollo o ayudando a mantener su supervivencia y diferenciación en individuos adultos [3]. Los GFLs y muy especialmente el GDNF, su miembro más estudiado, se han visto implicados esencialmente en distintos aspectos fisiopatológicos del sistema nervioso relacionados, sobre todo, con su capacidad de actuar sobre la regulación de la supervivencia neuronal.

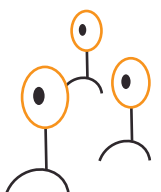
NRTN y ARTN comparten propiedades similares con el GDNF en el mantenimiento de sub-poblaciones neuronales *in vitro*, con PSPN como excepción, ya que no es capaz de promover la supervivencia de neuronas periféricas [3, 4, 12, 189]. No obstante, como veremos más adelante, el análisis *in vivo* de cada uno de estos ligandos y de sus respectivos receptores ha permitido discernir entre funciones que les son específicas de las redundantes.

## GDNF

GDNF es un miembro distante de la Superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  que fue originalmente aislado de la línea B49 de células gliales de rata [101]. GDNF se expresa a través del sistema nervioso central durante el desarrollo [32, 121, 149, 157] y también se expresa en el cerebro adulto, aunque en áreas más restringidas. Los niveles más elevados de este factor de crecimiento se encuentran en el cuerpo estriado (cuerpo estriado dorsal y núcleo accumbens), el tálamo, la corteza y el hipocampo. Un área de importante acción de GDNF es el mesencéfalo, en el que el factor de crecimiento se expresa a niveles bajos en condiciones basales [65, 154]. La mayor fuente de GDNF en el mesencéfalo es el estriado donde GDNF es transportado por las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra par compacta (SNpc) y el área tegmental ventral [16, 95, 97, 165].

Este factor es inicialmente sintetizado como una típica proteína de secreción, bajo una forma precursora inactiva de 211 aminoácidos, el pre-proGDNF, el cual da lugar al proGDNF. Posteriormente, el proGDNF secretado es entonces escindido proteolíticamente por una proteasa aún no identificada para dar lugar al producto activo de 134 residuos, el GDNF [144]. Aparentemente, GDNF y el resto de los GFLs se unen a las cadenas laterales de heparán-sulfato de los proteoglucanos de la matriz extracelular (ECM) [2, 70].

Inicialmente, fue purificado en 1993 como un factor de crecimiento capaz de promover la supervivencia de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, aquellas que degeneran durante la enfermedad de Parkinson, tanto *in vitro* [101] como *in vivo* [157, 165]. Posteriormente, se demostró que GDNF





era también un potente factor trófico para motoneuronas espinales [75, 122, 179, 190] y neuronas centrales noradrenérgicas [9]. Asimismo, el GDNF induce la proliferación de neuroblastos y promueve la supervivencia y/o diferenciación de diferentes tipos de neuronas del sistema nervioso periférico (PNS), entre las que se cuentan sub-poblaciones de neuronas simpáticas, parasimpáticas, sensoriales y entéricas [2, 3, 9, 25].

La administración de GDNF es capaz de reducir el daño ocasionado en condiciones de isquemia [118]; incluso puede prevenir la inducción de muerte en neuronas dopaminérgicas mediada por neurotoxinas en modelos de enfermedad de Parkinson [68], por lo que en la actualidad muchas de las investigaciones sobre este factor se centran en el tratamiento de ésta enfermedad mediante la administración de GDNF [60]. Igualmente, se ha observado que se produce una disminución en la incidencia de epilepsia en modelos de animales deficientes de GFR $\alpha$ 2, uno de sus receptores, [114]; o que GDNF participaría en los mecanismos de adicción a cocaína y morfina, donde se ha postulado que estos factores neurotróficos podrían servir en la terapia de recuperación [2].

Fuera del sistema nervioso, el GDNF tiene importantes funciones en el desarrollo renal y en la maduración de las células madre espermatogénicas [29, 112, 147, 177].

### NRTN

Otro miembro de los GFLs es la NRTN, este segundo miembro de la familia se descubrió tres años después que GDNF; siendo purificado como una fracción activa capaz de promover la supervivencia de neuronas simpáticas de rata [96]. La forma inmadura de NRTN, la pre-proNRTN está constituida por 195 aminoácidos de longitud constituido por una larga secuencia

señal de 19 aminoácidos seguidos de una pro-región de 76 aminoácidos. La NTN madura tiene, por tanto, 100 aminoácidos y comparte el 42% de similitud de secuencias con GDNF [96]. Curiosamente, en comparación con GDNF, NRTN carece de la mayor parte de la región N-terminal conformacionalmente lábil. La alta similitud de NRTN a GDNF, en comparación con otros miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$ , fue lo que permitió el establecimiento de una nueva familia de factores de crecimiento similares a TGF- $\beta$ : los GFLs [144].

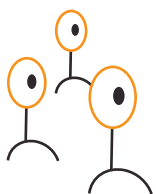
### ARTN

ARTN es el factor neurotrófico más joven perteneciente a la familia de los GFLs, su versión madura es una proteína de 113 aminoácidos que presenta siete residuos de cisteína conservados. Presenta similitudes con NRTN y PSPN (identidad de aproximadamente 45%), pero es algo más divergente de GDNF (identidad sobre 36%) [14].

### PSPN

Este tercer miembro en identificarse como parte de la familia se clonó mediante PCR [110]. La forma inmadura de PSPN presenta 156 aminoácidos de longitud, con un péptido señal de 21 residuos para originar una forma de PSPN madura de 96 aminoácidos de longitud, que también carece de la región N-terminal en comparación con GDNF. PSPN es un 40% idéntica a GDNF y NTN y tiene conservadas las siete cisteínas del nudo de cisteínas característico de la superfamilia [144].

Estudios han demostrado que PSPN es capaz de proteger *in vivo* de la muerte celular inducida por 6-OHDA a neuronas dopaminérgicas de rata adulta. Adicionalmente se ha observado que PSPN puede colaborar con la supervivencia



de motoneuronas *in vivo*, como demuestra por su efecto de rescate después de la axotomía del nervio ciático [110].

Funcionalmente, PSPN es el que más difiere en comportamiento con el resto de miembros de la familia debido a la elevada especificidad que presenta respecto a su co-receptor como veremos más adelante [180].

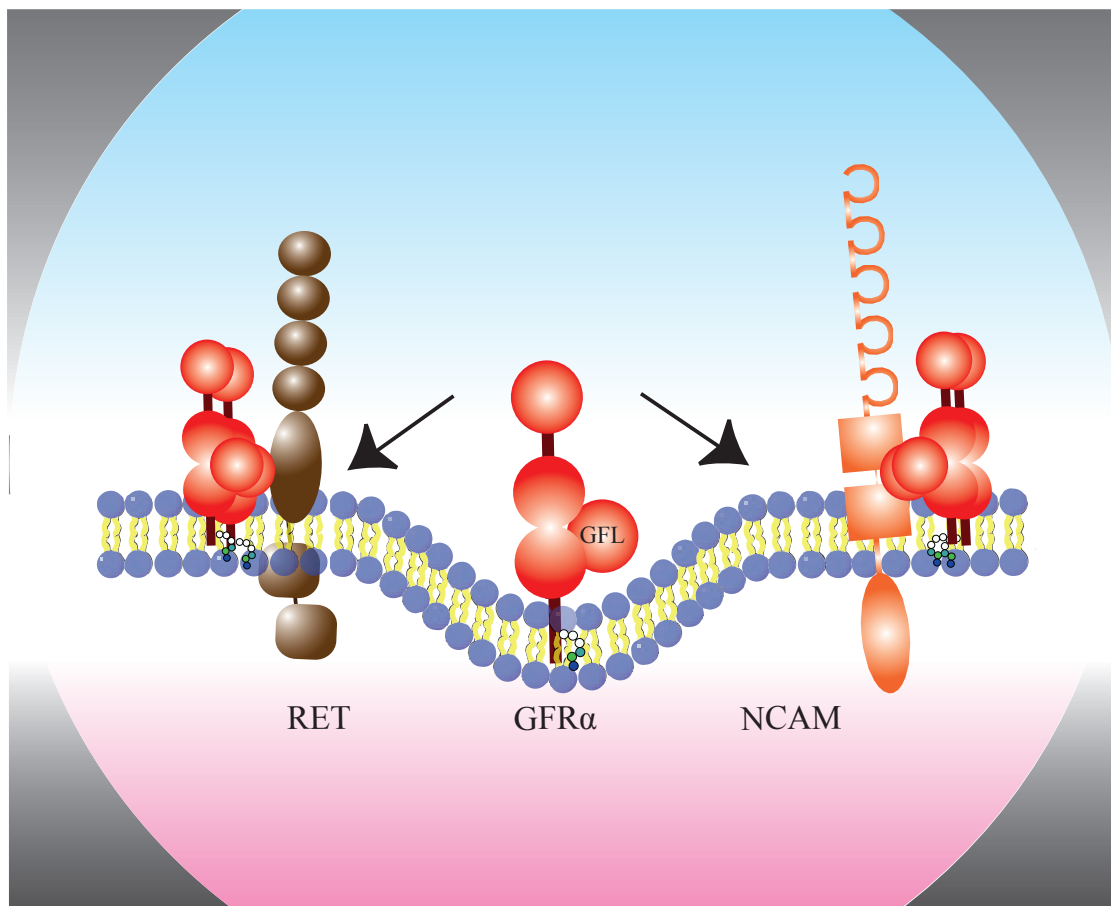
## **Receptores de GFLs**

GDNF, NRTN, ARTN y PSPN, los cuatro miembros conocidos en mamíferos de la familia de GFLs, [2, 3, 12] se unen de forma específica a la familia  $\alpha$  de receptores de GFLs ( $\text{GFR}\alpha$ ), una serie de proteínas unidas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) y que actúan realmente tan sólo como co-receptores, ya que por sí mismos son incapaces de señalizar [85, 166, 169]. Todos los GFLs interaccionan también con RET, un receptor tirosina

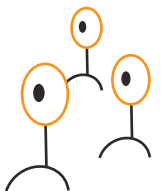
quinasa que es el mediador de la señalización transmembranal y que sólo se activa si el ligando está previamente unido a su co-receptor correspondiente [13, 47, 85].

### **$\text{GFR}\alpha$ : Co-receptores específicos**

Por especificidad de unión, los ligandos para los distintos co-receptores  $\text{GFR}\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$  son GDNF, NRTN, ARTN y PSPN, respectivamente [3, 12, 144]. Se han observado posibles interacciones cruzadas en modelos *in vitro* [13, 102] dando lugar a una cierta promiscuidad, de forma que ARTN y NRTN también pueden unirse, aunque con menor afinidad, a  $\text{GFR}\alpha 1$  y GDNF es capaz de hacerlo, tanto a  $\text{GFR}\alpha 2$ , como a  $\text{GFR}\alpha 3$ . Por el contrario,  $\text{GFR}\alpha 4$  de mamíferos sólo reconoce a PSPN debido a que presenta una estructura significativamente diferente de los restantes miembros [102], siendo este el único



**Figura I1. Modelo de interacción del complejo formado por GFLs/ $\text{GFR}\alpha$  con RET o NCAM.**



par ligando/co-receptor que presenta una especificidad total [3, 12, 125, 160].

Los mecanismos moleculares de señalización inducidos por los GFLs podrían ser comunes, puesto que todos los  $GFR\alpha$  se unen y activan al mismo RTK, e inducen la fosforilación coordinada de los mismos residuos tirosina de RET con cinéticas similares [35]. Sin embargo, cada miembro de la familia  $GFR\alpha$  posee un patrón de expresión único, que es dependiente del estado de desarrollo así como también específico del tejido o tipo celular de que se trate, lo cual sugiere que desempeñan papeles especializados en la activación de RET en cada contexto celular [12].

### Receptores de señalización

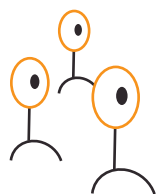
Como se ha dicho antes, todos los GFLs interaccionan por igual con RET, un receptor tirosina quinasa que es el mediador de la señalización transmembranal y que sólo se activa si el ligando está previamente unido a su correspondiente co-receptor. Se ha descrito que los co-receptores  $GFR\alpha$  presentan un rango de expresión más amplio que RET [121, 168, 182] y que los GFLs también son capaces de señalizar mediante rutas independientes de RET [129, 132, 169]. Adicionalmente, se ha descrito la existencia de otros receptores capaces de mediar sus acciones celulares, entre los cuales el principal es la molécula de adhesión de células neuronales o NCAM [126] (Figura I1). Esta interacción de NCAM con el complejo formado por los GFLs/ $GFR\alpha$  promueve la extensión axonal en cultivos de neuronas hipocámpales con o sin deficiencia de RET; no ocurriendo la prolongación de los axones en aquellas neuronas carentes de NCAM. Un punto importante en la señalización de los GFLs mediado por NCAM radica en que los eventos intracelulares implicados son

diferentes de aquellos mediados por la ruta canónica de RET [188].

### RET

El gen RET fue identificado en 1985 como un nuevo oncogén durante la transfección de células NIH3T3 con DNA aislado de linfoma de células T. El gen transformante resultaba de la recombinación entre dos secuencias de DNA no relacionadas, proceso que ocurría durante la transfección, motivo por el cual se lo denominó “REarranged during Transfection” -RET- (Reorganizado durante la transfección) [161]. La relevancia clínica de RET se vio aumentada posteriormente, cuando se demostró que ciertas mutaciones en este gen eran las responsables de dos desórdenes hereditarios conocidos: las Neoplasias Endocrinas Múltiples de tipo 2 (MEN 2A y MEN 2B) y la Enfermedad de Hirschsprung o Aganglioneosis Intestinal Congénita [84]. Desde entonces, la investigación sobre RET ha proporcionado valiosos datos sobre las interacciones moleculares que dan origen al sistema nervioso y al riñón, y ha esclarecido los eventos genéticos involucrados en el desarrollo de ciertos cánceres, malformaciones congénitas y otras patologías.

La unión de alta afinidad del GDNF a RET es mediada por  $GFR\alpha 1$  [85, 166]. RET no se une a GDNF por sí mismo, pero sí al complejo formado por GDNF y  $GFR\alpha 1$  [85, 166]. Inicialmente, el ligando, en forma de homodímero, da lugar a la formación de un complejo de alta afinidad con un homodímero de su correspondiente co-receptor  $GFR\alpha$ , los que debido a su “ancla” de GPI se encuentran localizados en los micro-dominios de la membrana plasmática llamados Lipid Rafts (Balsas lipídicas). Este conjunto tetramérico recluta entonces a dos moléculas de RET,





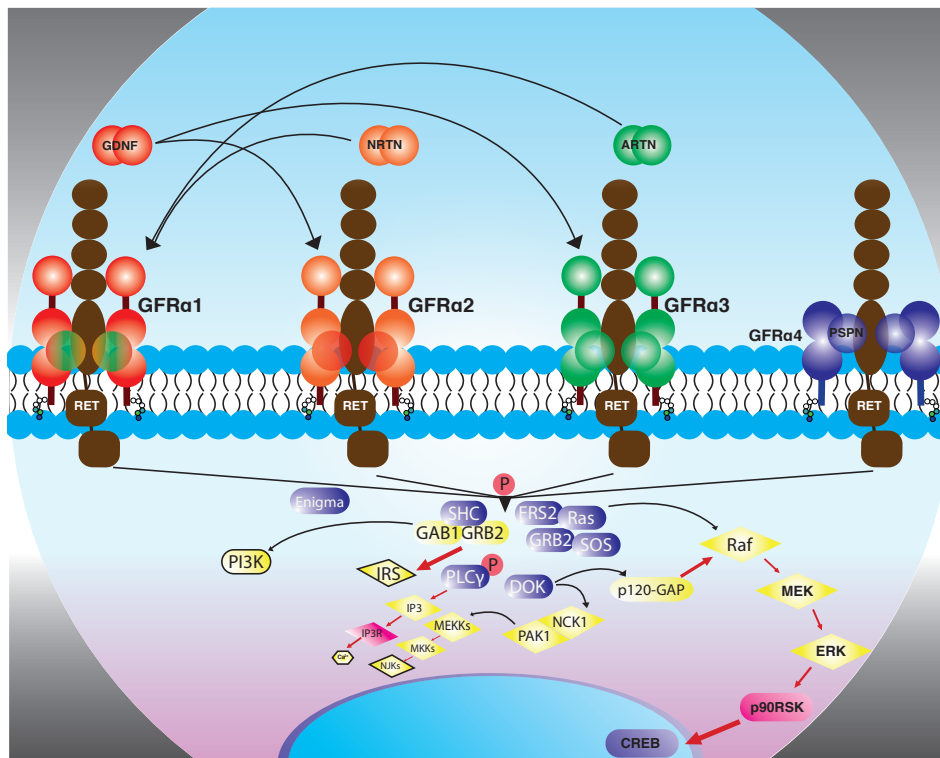
que al juntarse se auto-fosforilan de forma cruzada en residuos tirosina específicos de su dominio intracelular, iniciando así las cascadas de señalización hacia el núcleo celular [3, 148]. Los lipid rafts son micro-dominios especiales de la membrana plasmática, enriquecidos en esfingolípidos y colesterol, que se encuentran “empaquetados” formando plataformas móviles en el seno de la bicapa lipídica [71, 80]. Se ha sugerido que los lipid rafts funcionan como compartimientos de membrana altamente enriquecidos en parte de la maquinaria esencial de señalización celular [134], tales como proteínas con cadenas GPI (como los GFRs), las unidas a colesterol, aquellas doblemente aciladas (como la familia de quinasas parecidas a Src [SLK]), proteínas palmitoladas y algunas transmembranales [132].

Tras la activación de RET se lanzan diferentes cascadas de señalización encargadas de la regulación de diversas funciones biológicas

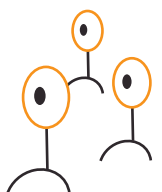
como supervivencia celular, diferenciación, proliferación, migración, quimiotaxis, morfogénesis, crecimiento de neuritas y/o plasticidad sináptica, entre otros. La interacción de RET y sus ligandos, origina un proceso de autofosforilación cruzada en residuos de tirosina específicos del dominio citoplasmático, indispensable para la señalización [35, 90, 103, 145, 178] a través de la unión de diferentes moléculas adaptadoras a los residuos tirosina fosforilados (Figura I2).

## Vía Erk/MAPK

La cascada Ras/Erk/MAPK (proteína con actividad reguladora GTP-hidrolasa/quinasa regulada por señales extracelulares/proteína quinasas activadas por mitógenos, respectivamente) se inicia cuando las moléculas adaptadoras SHC (proteína que contiene dominios de homología a Src de tipo 2 y 3 -SH2 y SH3) y/o FRS2 (sustrato 2 del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos) se unen a fosfo-Tyr1062 en RET.



**Figura I2. Rutas de señalización de GFLs mediante el receptor RET.** Adaptación de Interacciones de GFLs y receptores de Aron y colaboradores, 2011.



En el modelo más clásico y mejor estudiado, el complejo proteína 2 de unión al receptor del factor de crecimiento (Grb2) y el hijo de sevenless (SOS) es reclutado por estas moléculas adaptadoras. La unión de Grb2-SOS promueve el intercambio de una molécula del ribonucleótido guanosín difosfato (GDP) por un de guanosín trifosfato (GTP) en la pequeña proteína G Ras, desencadenando su activación, lo que se traduce en la fosforilación de Raf que, a su vez, fosforila y activa a MEK1/2 lo que determina la subsiguiente activación de las quinasas Erk1/2, que se translocarán al núcleo celular para modular la actividad de diversos factores de transcripción y la expresión de aquellos genes diana requeridos para las distintas funciones biológicas. Existen dos isoformas de RET, la isoforma larga Ret51 y la isoforma corta Ret9, y ambas contienen a la Tyr1062 aunque difieren en su extremo carboxilo terminal [39]. La isoforma Ret51, contiene adicionalmente a la Tyr1096, que es capaz de mediar la unión directa de Grb2, constituyendo una vía alternativa para la activación de esta cascada de señalización Ras/Erk/MAPK [167].

#### Vía PI3K/Akt

El complejo adaptador Grb2-SOS constituye un punto de bifurcación en la señalización inducida por Tyr1062 de RET, puesto que alternativamente puede reclutar a Gab1/2. Éstas interactúan directamente con la subunidad reguladora p85 de la enzima PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa).

El reclutamiento de PI3K cataliza la transformación de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) [72]; a partir de lo cual la amplia variedad de moléculas efectoras reclutadas por PIP3 da lugar a una compleja red de señalización, involucrando diversas funciones celulares. Una de las respuestas es el

papel de PI3K en la regulación del movimiento celular y la formación de lamelipodios. En este marco, la producción de PIP3 estaría relacionada con la modulación de la actividad de varias proteínas intercambiadoras de nucleótidos de Guanosina (GEFs) y proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), que a su vez regularían la función de las proteínas con actividad GTPasa, Ras y Arf, mediadores de los reordenamientos del citoesqueleto y la membrana plasmática indispensables para el movimiento celular [78, 138, 171].

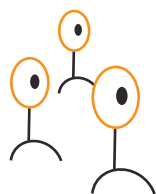
Otra de las funciones mediadas por la activación de PI3K en respuesta a factores de crecimiento resulta en el aumento del crecimiento, proliferación y supervivencia celular. Existen evidencias de que estas funciones celulares en respuesta a PIP3 están mediadas por la activación de la Proteína Quinasa B (PKB) o Akt [38, 45, 48, 62, 155, 176].

La ruta PI3K/Akt también ha sido implicada en la regulación del factor de transcripción nuclear KB (NF-KB), implicado en la modulación de diferentes procesos biológicos, como crecimiento celular, proliferación e inhibición de la apoptosis [73, 88, 140]. La función más ampliamente estudiada de NF-KB es su habilidad para promover la supervivencia celular mediante la inducción de genes diana, cuyos productos reprimen varios aspectos de la maquinaria apoptótica, tanto en células normales como transformadas [105].

#### Otras rutas de señalización

Como se ha indicado anteriormente, la fosforilación de tirosina 1062 (Tyr1062) de RET se encuentra implicada en la transmisión de señales hacia el interior celular porque actúa como un sitio de acoplamiento para múltiples proteínas adaptadoras y efectoras. Contrariamente, Enigma [46] y Shank3 que se unen exclusivamente a Tyr1062 de Ret9 [151], lo hacen independientemente de su estado de fosforilación.

Por otro lado, la elevación de los niveles de AMP cíclico (cAMP) resulta en la fosforilación



específica mediada por la Proteína Quinasa A (PKA) de otro residuo aminoacídico de RET, Serina 696 (Ser696). Este fenómeno es importante para la activación de Rac y la posterior formación de lamelipodios inducidas por GDNF/RET [54], indicando una función del receptor en la reorganización del citoesqueleto, que depende de la fosforilación de serinas.

### NCAM

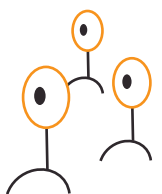
Otro receptor que puede participar en la señalización inducida por el complejo GFL/GFR $\alpha$  es NCAM. La molécula de adhesión celular neural (NCAM) pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y participa en distintos aspectos del desarrollo del sistema nervioso. Aunque existen dos NCAM, altamente relacionadas, NCAM1 descubierta en 1974 [87] y NCAM2 en 1997 [124], sólo se ha demostrado que NCAM1 sea capaz de participar en la ruta de señalización de los GFLs, por lo que nos referiremos como NCAM exclusivamente a NCAM1. Existen múltiples isoformas de esta molécula, tres de ellas son las más importantes que, debido a su peso molecular en kDa, se denominan NCAM-120, NCAM-140 y NCAM-180, en las que su diferencia de tamaño viene dada por el dominio citoplasmático [113]. El dominio extracelular de NCAM-120 se une a la membrana a través de un GPI de anclaje, mientras que las otras dos isoformas son proteínas transmembranales. NCAM-180 y NCAM-120 se expresan exclusivamente en las neuronas o en células de glía, respectivamente, mientras que NCAM-140 se expresa en ambos tipos celulares [120]. El ectodominio de NCAM presenta dos módulos proximales de fibronectina de tipo III seguidos por cinco módulos de tipo inmunoglobulina (Ig). NCAM es portador dominante de ácido polisialílico (PSA), que se encuentra unido post-translacionalmente al quinto módulo de Ig. El PSA presente en NCAM disminuye en cerebro adulto, mientras el resto queda confinado a áreas de alta plasticidad (como el bulbo olfatorio y giro dentado del hipocampo). NCAM media la adhesión celular mediante

unión homofílica; siendo importante destacar que no solo funciona como un pegamento que adhiere a las células y las une, sino que es capaz de iniciar la formación de una señalización proximal a la membrana intracelular, activando de este modo una compleja red de transducción de señales.

La ausencia del gen NCAM genera ratones aparentemente sanos y fértiles; sin embargo, son un 10% más pequeños, presentando una reducción del 10% en el peso del cerebro y del 36% del bulbo olfatorio. Adicionalmente, presentan déficit de aprendizaje espacial, aunque su habilidad y actividad motora es aparentemente normal. Los cambios de comportamiento que presentan los individuos son similares a los obtenidos en animales deficiente para calcio calmodulina quinasa II (CaMKII) o para Fyn tirosina quinasa [37]. En el cerebro adulto, NCAM está implicada en la plasticidad sináptica, incluyendo los procesos de aprendizaje y la memoria, y se ha vinculado a trastornos cerebrales humanos tales como la enfermedad de Alzheimer [163] o la esquizofrenia [172], entre otros.

Su señalización intracelular se realiza a través de interacciones heterófilas, mediante las cuales es capaz de regular la diferenciación, la proliferación y la supervivencia [7, 152, 153]. NCAM interactúa con el receptor de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), la molécula de adhesión celular L1 (CAM-L1) y diversos componentes de la matriz extracelular; adicionalmente, se ha visto implicada en regular la señalización a través de los receptores para varios factores de crecimiento; como el BDNF [173], el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) [185], el factor de crecimiento epidérmico (EGF) [133], además del GDNF y otros GFLs [126].

La familia de proteínas NCAM, interaccionan a nivel extracelular con diversas moléculas, entre las que se encuentran la proteína celular priónica (PrPc) que tiene como funciones



la protección en contra de apoptosis y estrés oxidativo, uniones a iones de cobre, señalización transmembranal, formación y mantenimiento de sinopsis y adhesión a la matriz extracelular [57]; la glicoproteína axonal transitoria 1 (TAG-1) involucrada en crecimiento axonal [57] y la proteína transmembranal CAM-L1, involucrada en la potenciación de la migración celular y crecimiento de neuritas [150].

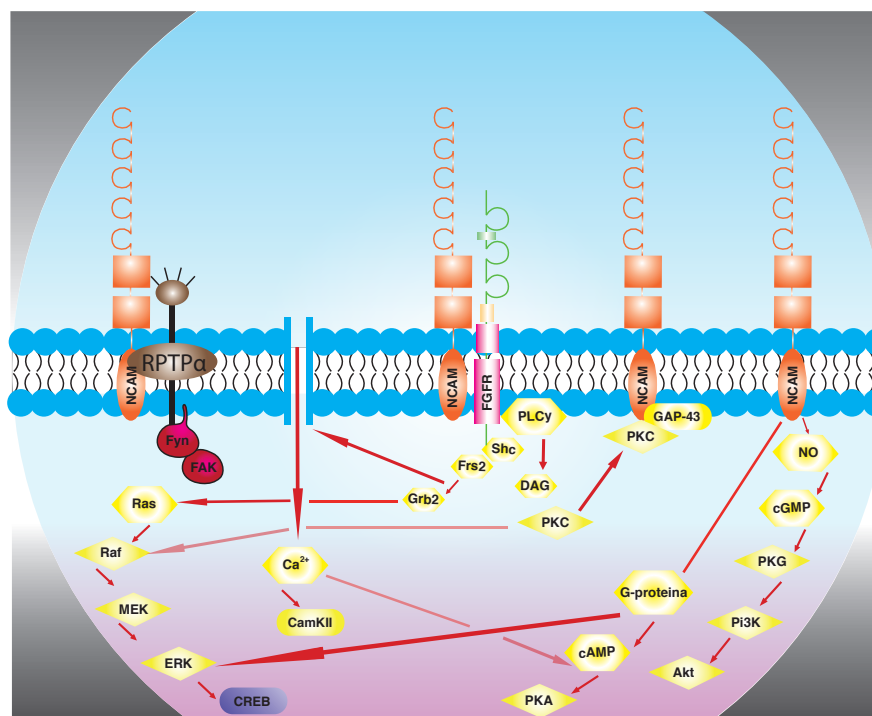
La traducción de señales mediada por el receptor NCAM para actuar sobre el crecimiento de neuritas o en la supervivencia neuronal depende de complejas rutas de señalización que comprenden desde estimulaciones de la superficie celular hasta los cambios en la composición del citoesqueleto y expresión genética [40]. Así, por ejemplo, CAM-L1 es capaz de mediar el crecimiento de neuritas y la supervivencia neuronal, pero para este último fenómeno CAM-L1 es insuficiente y requiere de la actuación de NCAM [40], FGFR, cAMP y PKA [104].

NCAM media diversas rutas de señalización intracelulares (Figura I3), entre las cuales se encuentra la activación de canales de calcio

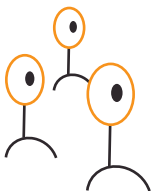
voltaje-dependientes (VDCCs), ruta mediante la cual las motoneuronas podrían expandir el territorio sináptico [31], adicionalmente se ha descrito que NCAM puede mediar la activación de VDCCs en colaboración con FGFR [93]; esta molécula de adhesión también se ha visto involucrada en la activación de proteínas G heterotriméricas [43]. Su señalización también implica a la quinasa similar a Src (SLK) Fyn y la quinasa de adhesión focal (FAK), que puede estar activada por interacciones NCAM1/RPTP $\alpha$  (miembros de la familia de receptores proteína tirosina fosfatasa) o mediante NCAM/Complejo GFLs-GFR $\alpha$  [126]. Asimismo, la señalización intracelular inducida por NCAM incluye las rutas Ras-MAPK, PI3K-Akt y la activación de PKA mediada por cAMP [42].

#### Vía FGFR

Los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFRs) son receptores tirosina quinasa de superficie (RTKs) que, tras la unión a factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), dimerizan y transfosforilan [19], lo que les confiere la capacidad de unión para diversas proteínas adaptadoras y efectoras



**Figura I3. Rutas de señalización de mediadas por el receptor NCAM.**  
Adaptación de Interacciones de Ditlevsen y colaboradores, 2010.



que se traduce en la activación de diversas rutas de señalización intracelular [51, 56]. Los efectores más comunes son Shc y el sustrato  $2\alpha$  de FGFR (FRS- $2\alpha$ ), que mediante el reclutamiento del complejo Grb2-SOS inducen la activación de la ruta de Ras-Raf-Erk 1/2 [56]. La unión de su ligando a FGFR y, como ocurre en general a todos los RTKs, llevan a su internalización, ubiquitinación (mediada por Cbl, linfoma Casitas de linaje B), seguido de una degradación lisosomal [175].

Otra ruta no canónica que puede modular la activación de FGFR es su unión a proteínas membranales; entre las que se encuentra NCAM [131]. Para finalizar podemos remarcar el rol que juega FGFR en la señalización mediada por NCAM en el crecimiento de neuritas y supervivencia neuronal así como en la activación de la ruta MAPK [41].

### Vía CaMKII

CaMKII, la proteína más abundante en el cerebro de los mamíferos [22, 66, 187], se encuentra implicada en el crecimiento de neuritas mediada por NCAM [174]. Estudios de Ditlevsen y sus colaboradores han confirmado la importancia de la señalización CaMKII/NCAM-dependiente para el crecimiento de neuritas de neuronas dopaminérgicas [40]. La actividad de CaMKII se modula mediante la unión a la calmodulina activada en el sitio de unión de  $Ca^{2+}$ . Aparentemente, la ruta de señalización de NCAM mediada por FGFR, es capaz de activar a CaMKII a través de la cascada mediada por la fosfolipasa C (PLC) / diacilglicerol (DAG) / ácido araquidónico /  $Ca^{2+}$ . En apoyo de lo anteriormente descrito, el crecimiento de neuritas inducido por la estimulación de  $Ca^{2+}$  o por la adición de FGF2 se impide por un inhibidor de CaMKII [174].

### Vía Fyn

Una de las rutas principales de señalización de NCAM, junto con la de FGFR, es la mediada por Fyn, uno de las SLKs [20], que resulta esencial para el crecimiento de neuritas mediado por NCAM. La activación de Fyn

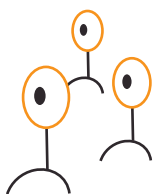
depende de la actividad de RPTP $\alpha$ , proteína que, al igual que Fyn y NCAM, se encuentra altamente expresada en neuronas y conos de crecimiento axonal.

Interesantemente, Fyn sólo se asocia a NCAM-140 (cuya expresión es tanto glial como neuronal) y no así a las más específicas NCAM-120 o NCAM-180. En cualquier caso, el clustering de NCAM en la membrana celular da lugar a la activación transitoria de Fyn que, a su vez, es capaz de reclutar y activar a la quinasa de adhesiones focales FAK [42].

## **Funciones Fisiológicas de los GFLs en el Desarrollo y Funcionamiento del Sistema Nervioso**

Los GFLs desempeñan un papel crucial en el desarrollo y funcionamiento del Sistema Nervioso [2,3]. Así, los ratones nulos para los genes de RET, GDNF o GFR $\alpha$ 1 mueren durante las primeras horas postnatales y comparten un fenotipo caracterizado por agénesis renal y la ausencia de diferentes tipos de neuronas parasimpáticas y entéricas [3]. Por el contrario, aquellos ratones en los que se han eliminado otros miembros de la familia o sus co-receptores, son viables y fértiles. La gran similitud a grandes rasgos entre los fenotipos de ratones knock out para cada ligando y su respectivo co-receptor indican la fuente asociación funcional existente entre cada factor y su correspondiente GFR $\alpha$  in vivo (Tabla I). La gran mayoría de tejidos y células que se ven afectados en ratones nulos para GFLs o para GFRs también expresan RET, demostrando que es éste el principal receptor que media la señalización de los GFLs in vivo.

Los animales knock-out para NRTN o GFR $\alpha$ 2 presentan alteraciones en la innervación entérica y parasimpática. Sin embargo, sólo los ratones nulos para GFR $\alpha$  presentan retardos en el crecimiento, quizá por los múltiples defectos de la innervación a lo largo del tracto digestivo. Esta discrepancia en el crecimiento

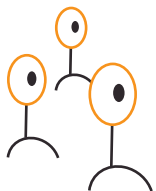




Gen Knockout	GDNF o GFR $\alpha$ 1	NRTN o GFR $\alpha$ 2	ARTN o GFR $\alpha$ 3	PSPN o GFR $\alpha$ 4	RET	NCAM
General	Letal al nacer	Pseudoptosis, fértiles. GFR $\alpha$ 2-/- retardo del crecimiento	Ptosis, viables, fértiles	GFR $\alpha$ 4-/- viable, fértil	Letal al nacer	Viable, fértil
Viscerosensorial	Defectos de respiración. PG: 40% de pérdida neuronal	ND	ND	GFR $\alpha$ 4-/- ND	Defectos de respiración	36% menos peso de BR
Somatosensorial	TG: defectos de mielinización del folículo de whisker DRGNs: #NS, menor tamaño del soma <sup>7</sup>	DRGNs: menor tamaño del soma, pérdida de sensibilidad al calor	DRG: NS	GFR $\alpha$ 4-/- ND	DRG: NS	ND
Simpático	SCGNs: NS o pérdidas sutiles de neuronas	SCGNs: NS	SCG: defectos de migración e invasión o menor proliferación, la mayoría de las neuronas mueren en P60	GFR $\alpha$ 4-/- ND	SCG: defectos de migración y en el crecimiento axonal inicial; sutil deficit en otros ganglios	ND
Parasimpático	No SPG ni OG; número y tamaño de soma en SMG y otros ganglios	SPGNs: número NS, pero carencia de invasión,; reducido número, tamaño del soma e invasión en otros ganglios	SMGNs: NS	GFR $\alpha$ 4-/- ND	No SPG ni OG; número y tamaño de soma en SMG y otros ganglios	ND
Entérico	Carecen de neuronas en intestino debajo del estómago	Pérdida moderada de fibras en el intestino delgado, reducción de la motilidad	NS	GFR $\alpha$ 4-/- ND	Carecen de neuronas en intestino debajo del estómago	ND
Motor	Pérdidas neuronales en varios núcleos	No se observan mayores defectos	ND	ND	Pérdidas neuronales en varios núcleos	NS
Cerebro	SN: NS, GDNF +/- presenta defectos en el aprendizaje en ratón adulto	Deficit sutil en la transmisión sináptica en hipocampo	No se observan mayores defectos	No se observan mayores defectos <sup>3</sup>	SN: NS	NS, aunque el cerebro presenta un peso menos al de un cerebro adulto.
Otros	Falta de riñones, degeneración testicular en ratón adulto GDNF+/-	ND	ND	ND	Falta de riñones, moderada pérdida de células tiroideas C (productoras de calcitonina)	Menor tamaño (10%). Habilidad espacial y motora aparentemente normal

Si no se especifica los fenotipos se refieren a GDNF y GFR $\alpha$ 1 knockouts, adultos en los otros, recién nacidos en RET. DRGNs, neuronas de ganglios de la raíz dorsal. BR, bulbo raquídeo; ND, no determinado; NS, no significativo; OG, ganglio ótico; P60, día posnatal 60; PG, ganglio petrosal; SCGNs, neuronas de ganglio cervical superior; SMGNs, neuronas de ganglio submandibular; SPGNs, neuronas de ganglio esfíngo-palatino; SN, sustancia negra; TG, ganglio trigémino.

**Tabla I. Fenotipos de ratones knock out para cada ligando y su respectivo co-receptor de GFLs.**  
Adaptación de Tabla Airaksinen y Saarma, 2002.



entre ratones deficientes para NRTN y GFR $\alpha$ 2 podría deberse al hecho de que, en ausencia de NRTN, GDNF podría unirse de forma cruzada a GFR $\alpha$ 2 y rescatar el fenotipo, aunque no se pueden descartar efectos debidos a diferencias en el contexto genético y/o en los hábitos alimenticios.

Aunque los ratones nulos para GFR $\alpha$ 2 y GFR $\alpha$ 3 comparten un fenotipo de ptosis (párpados superiores caídos), las causas son completamente diferentes; en ratones en los que se ha eliminado la expresión de GFR $\alpha$ 2 se observa una carencia de innervación parasimpática en la glándula lacrimal, mientras que en el caso de knock out para GFR $\alpha$ 3 se debe a una ausencia de innervación simpática en el músculo elevador del párpado que genera incapacidad para mantener el párpado superior levantado [119]. Los ratones nulos tanto para NRTN como para ARTN presentan presentan la ptosis similar a la debida a la ausencia de los co-receptores GFR $\alpha$ 2 y 3.

Por otro lado, algunos miembros de la familia de GDNF parece tener la capacidad de regular la expresión de su correspondiente co-receptor de forma específica, puesto que en ratones nulos para GDNF la expresión de GFR $\alpha$ 1 en ganglios periféricos disminuye, mientras que en animales knock out para NRTN ocurre lo opuesto [3]. Este tipo de regulación podría ser independiente de la señalización por RET, puesto que la expresión de GFRs en ratones nulos para RET no se encuentra alterada [162].

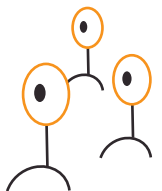
### Neuronas Simpáticas

Aunque los fenotipos de ratones nulos para RET, GDNF o GFR $\alpha$ 1 son muy similares (Tabla I), se pueden encontrar algunas diferencias. Inicialmente se determinó que los ratones knock-out para RET carecen totalmente de Ganglios Cervicales Superiores (SCGs), mientras que los ratones knock-out para GDNF sólo presentan una pérdida neuronal del 35%, y en animales nulos para GFR $\alpha$ 1 no se produce una disminución significativa [3, 12]. Esto parecería estar a favor de la hipótesis según la

cual GDNF podría ejercer sus efectos a través de otro miembro de la familia de los GFRs (probablemente GFR $\alpha$ 2) y/o que otros GFRs podrían inducir la activación de RET durante el desarrollo del SCG. Más tarde, se demostró que la eliminación de la expresión de RET no produce la desaparición propiamente dicha del SCG, sino que, en realidad, afecta a la migración de los precursores que lo originarían, así como a la innervación de órganos diana [49]. Los ratones nulos para GFR $\alpha$ 3 [119] y RET [49] dejan patente el rol importante de la señalización del sistema ARTN/GFR $\alpha$ 3/RET durante la migración de los precursores de SCGs [119]. ARTN es un factor quimiotáctico producido en la vecindad de los ganglios simpáticos en desarrollo y que posteriormente se expresa en vasos sanguíneos de gran calibre, a lo largo de los cuales los axones de dichas neuronas simpáticas irán creciendo hasta alcanzar sus órganos y tejidos diana. En los ratones nulos se observa que las SCGs presentan defectos no solo en migración celular, sino que también se encuentra afectada la proliferación (que está reducida), y la innervación, todo lo cual lleva a que acaben muriendo (aunque inicialmente sean viables y fértiles) en estadio postnatal 60 (P60) aproximadamente.

En estadios tardíos del desarrollo embrionario las neuronas simpáticas se vuelven independientes de ARTN a través de una regulación negativa de la expresión de GFR $\alpha$ 3, al tiempo que se vuelven dependientes de la señalización mediada por NGF, que comienza a ser secretado por los tejidos diana de la innervación. De esta manera, las neuronas simpáticas del SCG de ratones knock out para GFR $\alpha$ 3 aparentemente mueren debido a que sus axones no logran alcanzar sus dianas de innervación adecuadamente y, por ende, no reciben soporte trófico (NGF).

Todos estos resultados indican que durante el desarrollo de neuronas simpáticas la señalización quimiotáctica de ARTN/GFR $\alpha$ 3/RET es necesaria para la migración y el crecimiento axonal de estas células.



### Neuronas Parasimpáticas

Al referirnos a neuronas parasimpáticas se hablará de neuronas posganglionares, ubicadas en ganglios cercanos o dentro de sus tejidos diana. En ratones knock out para RET, GFR $\alpha$ 1 o GDNF recién nacidos los ganglios esfenopalatino y ótico se encuentran ausentes, indicando que la señalización a través de este sistema es esencial para el desarrollo de estas neuronas parasimpáticas durante la embriogénesis [12, 143]. Los precursores parasimpáticos expresan RET y GFR $\alpha$ 1, mientras que GDNF es secretado por los tejidos que los rodean durante su migración, por lo que la señalización por GDNF/GFR $\alpha$ 1/RET es necesaria para la migración y proliferación de los precursores de neuronas parasimpáticas durante el desarrollo embrionario temprano. La expresión de GFR $\alpha$ 1 en neuronas parasimpáticas es regulada negativamente antes del nacimiento, pero continúan expresando RET y GFR $\alpha$ 2, a medida que la producción de NRTN por parte de tejidos diana aumenta [12, 143]. Los ratones nulos para NRTN o GFR $\alpha$ 2 presentan defectos variables en la innervación parasimpática. Por lo tanto, las funciones principales de NRTN en este ganglio parasimpático (y presumiblemente en otros) serían promover y guiar la innervación de tejidos diana y mantener el tamaño neuronal o estatus trófico. También se ha observado que las fibras nerviosas parasimpáticas y células gliales que se localizan dentro y alrededor de los islotes de Langerhans del páncreas endocrino, expresan GFR $\alpha$ 2, mientras que la innervación parasimpática de dichos islotes en ratones nulos para GFR $\alpha$ 2 se encuentra severamente reducida [142]. Por otra parte, encontramos que ARTN promueve la supervivencia y regula la diferenciación de diversas neuronas parasimpáticas [2, 3].

### Neuronas Entéricas

El sistema GDNF/GFR $\alpha$ 1/RET resulta fundamental para el desarrollo de las neuronas y células gliales entéricas que innervan el tracto

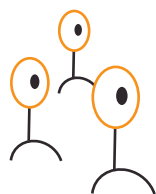
digestivo desde el estómago hasta el colon [14, 26, 112, 146] y, en ratones knock-out para RET, GFR $\alpha$ 1 o GDNF, las neuronas y células gliales entéricas derivadas de la cresta neural vagal y sacra se encuentran ausentes desde el estómago [108]. GDNF se expresa en células mesenquimales del intestino donde promueve la migración, proliferación, supervivencia y diferenciación de las células precursoras entéricas derivadas de la cresta neural, que expresan RET y GFR $\alpha$ 1 [162]. Por otro lado, se observa que la disrupción de la expresión de GFR $\alpha$ 1 en estadios tardíos del desarrollo del sistema nervioso entérico (ENS), resulta en una rápida y extensa muerte neuronal en el colon [12], llevando a un fenotipo similar al observado en la Enfermedad de Hirschsprung [170].

Los ratones nulos para NRTN también muestran defectos en el ENS, entre ellos una reducción en la densidad de nervios en el plexo mientérico y una menor movilidad gastrointestinal [76], mientras que ARTN permite la supervivencia y es capaz de influir sobre la diferenciación de neuronas entéricas [2, 3].

### Neuronas Sensoriales Somáticas

Los GFLs pueden mantener distintas subpoblaciones de neuronas sensoriales primarias in vitro e in vivo.

En estadio embrionario, muchas neuronas sensoriales del Ganglio Nodoso-Petroso requieren para su supervivencia la señalización de GDNF y BDNF, que son secretados desde los tejidos diana de su innervación [50]. Dichas neuronas sensoriales viscerales innervan al cuerpo carotídeo participando en el control central de la respiración. Los animales nulos para RET y GDNF presentan alteraciones respiratorias, mientras que mutaciones puntuales en estos genes han sido asociadas con el Síndrome de Hipoventilación Central Congénita o Síndrome de Ondine [6]. La mayoría de neuronas sensoriales de los Ganglios Raquídeos (DRGs) y del Ganglio Trigémico (TG) requieren NGF para





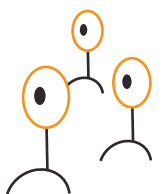
sobrevivir durante el desarrollo embrionario. En estadios postnatales tempranos, una población de células cambian la expresión de TrkA por la de RET [156], siendo estas neuronas esencialmente las mediadoras de la sensación de dolor y temperatura en la piel. En ratones nulos condicionales para RET, se observó que su expresión no es indispensable para la viabilidad de las neuronas de los DRGs in vivo, pero sí para lograr el tamaño normal del soma de las neuronas DRGs, para la correcta innervación axonal de la epidermis, la eliminación postnatal de la expresión de TrkA y la correcta expresión de genes específicos de esta subpoblación neuronal. Durante la embriogénesis, los mRNAs de GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2 y GFR $\alpha$ 3 se expresan en nervios periféricos y se coexpresan con RET en subpoblaciones parcialmente superpuestas de neuronas sensoriales [21], mientras que las regiones sensoriales diana, como la epidermis o los folículos de los bigotes (en el ratón), expresan GDNF y NRTN [55], aunque GDNF no es detectado posteriormente en la piel de individuos adultos [65], pero sí tanto en células de Schwann como en las capas superficiales de la médula espinal [86]. El mRNA de ARTN es encontrado en las raíces de nervios periféricos en desarrollo, disminuyendo en los adultos. GFR $\alpha$ 1 y RET son expresados en una subpoblación de neuronas mecanosensoriales mielinizadas. En cualquier caso, las evidencias in vitro indican que las neuronas somatosensoriales comienzan a depender de GDNF tan sólo en estadios postnatales [17], lo que concuerda con que el número de neuronas sensoriales en DRGs de ratones recién nacidos nulos para GFR $\alpha$ 1 [3] o GDNF [123] no se encuentra afectado. La señalización de GDNF resulta necesaria posteriormente para su supervivencia, o mantenimiento de una correcta innervación, entre otras. También GFR $\alpha$ 2 es expresado en ganglios sensoriales, concordando con el hecho de que NRTN sea capaz de mantener la supervivencia en cultivo de sub-poblaciones de neuronas de DRG y TG [21, 96, 116]. Aunque no se ha

detectado una disminución en el número de neuronas sensoriales en ratones knock out para NRTN o GFR $\alpha$ 2, las neuronas que expresan GFR $\alpha$ 2 de los ganglios sensoriales de ratones nulos para NRTN se encuentran reducidas en tamaño [76].

GDNF, NRTN, ARTN y sus respectivos co-receptores solapan parcialmente con la subpoblación de DRGNs positivas para Ret [21], aunque tanto la expresión de Ret como la de los co-receptores de los respectivos factores comienza durante el desarrollo embrionario y continúa hasta la estadio adulto [17].

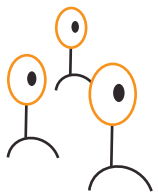
### Neuronas Motoras

Los factores tróficos producidos por el músculo y las células gliales actúan de forma sinérgica para promover la supervivencia de neuronas motoras [8]. Durante el desarrollo, GDNF es producido principalmente por las células de Schwann. En embriones de ratones knock out para GDNF y GFR $\alpha$ 1 se observa una reducción sustancial de neuronas motoras espinales y craneales (entre 20% y 40%, según cada región) y debido a un aumento correspondiente de la muerte celular [61]. En ratones nulos de RET se producen pérdidas en todas las subpoblaciones de neuronas motoras estudiadas [2]. Con respecto a NRTN, aunque su aporte exógeno también mantiene la supervivencia de neuronas motoras en cultivo, este proceso se realiza principalmente a través de GFR $\alpha$ 1, ya que en ratones nulos para GFR $\alpha$ 2 no se observan pérdidas obvias de dichas neuronas [61]. Al contrario, la inyección continuada de GDNF (pero no de NRTN) en estadios postnatales [91] o la sobre-expresión específica de GDNF en el músculo esquelético [191], producen una hiper-innervación durante la creación de la unión neuromuscular (NMJ) que se mantiene en estadios posteriores. El sistema GDNF/RET funciona como una señal de orientación o guía para ciertos axones de neuronas motoras durante el establecimiento de la innervación de músculos de las extremidades dorsales, de tal forma que, en estos ratones mutantes,



los axones de las motoneuronas siguen una trayectoria ventral aberrante, alejándose de las regiones dorsales enriquecidas en GDNF. Todo ello hace que la ausencia de RET genera un

déficit en la maduración motoneuronal y en la especialización de terminales neuromusculares pre-sinápticos de ciertos grupos de neuronas motoras [18].



## **OBJETIVOS**

Como objetivo general el presente trabajo pretende:

Identificar la capacidad de los miembros de la familia de ligandos de GDNF para regular el proceso de mielinización en el sistema nervioso periférico.

Los objetivos específicos requeridos para demostrar la acción de los GFLs en la formación de mielina periférica se enumeran a continuación:

1. Caracterizar la presencia de los distintos receptores de factores neurotróficos de la familia de GDNF, tanto en cultivo, como durante el proceso de mielinización *in vivo* durante el desarrollo del nervio ciático. De forma paralela, también se analizarán los niveles de los distintos factores.
2. Analizar el efecto de GDNF, Neurturina, Artemina y Persefina sobre la formación de mielina, así como determinar la contribución relativa de las posibles rutas de transducción de señales implicadas en este proceso.
3. Determinar el efecto de GDNF, Neurturina, Artemina y Persefina sobre la migración y proliferación de SCs y las posibles rutas implicadas en dichos procesos.





# MATERIALES Y MÉTODOS

## Factores Neurotróficos y Drogas

El NGF (purificado de glándula submaxilar de ratón, AbD Serotec) se utiliza habitualmente a 100 ng/mL, disueltos en medio de cultivo a partir de una solución concentrada preparada en agua Milli-Q.

Los GFLs utilizados fueron GDNF (Rat Recombinant Protein, Preprotech), NRTN (Rat Recombinant Protein, Preprotech), ARTN (Human Recombinant Protein, Preprotech) y PSPN (Human Recombinant Protein, Preprotech). Los distintos GFLs se utilizan habitualmente a 25ng/mL.

El inhibidor de CAM quinasa II, KN62 (420706. MERCK, Calbiochem®) [81], el de FGFR1, SU5402 (572630. MERCK, Calbiochem®)[5], y el inhibidor del receptor tirosina quinasa RET (554340. MERCK, Calbiochem®) se usaron a una concentración final de 10µM [139]. El inhibidor de SLKs, PP2 (529573. MERCK, Calbiochem®) [81] se utilizó a una concentración final de 5µM. Todos los inhibidores de la ruta NCAM, se prepararon a partir de una solución stock 10mM mientras que la solución stock del inhibidor de RET fue de 100mM; todos en DMSO (Dimetil Sulfóxido, Sigma-Aldrich), realizando las diluciones intermedias en HBSS 1x pH 6.7 - 7.8 (Gibco®-Invitrogen).

## Cultivos Celulares

### **Medios de Cultivo**

#### Medio de Neuronas DRGs / Cocultivos

M1: Minimum Essential Media (MEM, Gibco®-Invitrogen) suplementado con 25 mM de glucosa, 10% de suero bovino fetal (Sigma-Aldrich) inactivado por calor durante 30 min. a 56°C (FBS H.I.) y 100 ng/mL NGF .

E2F: MEM suplementado con 10 µM fluorodeoxiuridina/uridina (Sigma-Aldrich), 1% de suplemento N2 (Gibco®-Invitrogen), 25 mM Glucosa y 100 ng/mL NGF.

DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (Gibco®-Invitrogen) suplementado con 1 mM L-Glutamina (Gibco®-Invitrogen), 1% de suplemento N2 (Gibco®-Invitrogen), 25 mM de Glucosa y 100 ng/mL NGF.

NB: Neurobasal™ Medium (Gibco®-Invitrogen), 1mM de L-Glutamina, 2% de suplemento B27® Serum Free Supplement (Gibco®-Invitrogen) con/sin 100 ng/mL NGF. NB/FdU: Neurobasal™ Medium con 10 µM fluorodeoxiuridina/uridina, 2% de suplemento B27® y 100 ng/mL NGF.

#### Medio de SCs

DMEM/FBS H.I.: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco®-Invitrogen) suplementado con 10% de FBS H.I y Gentamicina 20 µg/mL. DM (Medio definido): Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 suplementado con 1mM L-Glutamina, 100 µg/mL de transferrina bovina (Gibco®-Invitrogen), 5 µg/mL de insulina, 10,1 ng/mL de triyodotironina (T3), 0,4 µg/mL de tiroxina (T4), 160 ng/mL de selenio, 38ng/mL de dexametasona, 60 ng/mL de progesterona (Todos de Sigma-Aldrich) y en algunos casos se añade 10% FBS H.I.

### **Pretratamiento de placas**

#### Poli-L-Lisina

La Poli-L-Lisina (Sigma -Aldrich), es un polícatión utilizado típicamente como un sustrato de recubrimiento para placas de cultivo. Esta permite mejorar la interacción electrostática entre los iones de carga negativa de la membrana celular y la superficie de cultivo, aumentando de este modo el número de sitios cargados positivamente disponibles para la unión celular. La concentración utilizada es 0,1 mg/mL. Se emplea en conjunto con el Colágeno para el establecimiento de cocultivos y sola en cultivos de SCs.

En breve, tras cubrir completamente la superficie a tratar con la solución de Poli-L-Lisina, las placas se incuban durante 1 hora a



Temperatura Ambiente (TA) y, tras eliminar el exceso mediante aspiración seguida de tres lavados con agua MilliQ estéril. Para el establecimiento de cultivos de neuronas, las placas se dejan secar de 16 a 24 horas antes de ser tratadas con colágeno.

### Colágeno

El Colágeno (Colágeno Tipo I de cola de rata), es un sustrato simple para el establecimiento de cultivos neuronales. Este fue producido en el laboratorio de acuerdo a modificaciones en los métodos descritos por Bornstein y colaboradores [24, 137].

Tras diseccionar las colas a partir de machos adultos mayores de 6 meses de edad, se lavan muy bien con jabón antiséptico y luego son aclaradas con alcohol al 70% y se congelan durante un periodo igual o mayor a 24h a -20°C en una placa de Petri con papel de filtro; al día siguiente se esterilizan mediante su inmersión en alcohol al 70% durante 20 minutos y se dejan secando en una placa de Petri con papel de filtro en condiciones de esterilidad. Para obtener los tendones, se sostiene la cola a 1-1,5 cm del final (donde se acorta la punta) con dos hemostatos, se fracturan las vértebras sin cortar los tendones (que van desde el músculo pelviano y recorren toda la cola, uniéndose a cada vértebra), una vez fracturada cada vértebra, ésta se empuja lateralmente con la finalidad de separarla del resto de la cola; de este modo los tendones son empujados hacia afuera con ella. Tras liberar el fragmento de vértebra despegado, los tendones se cortan con una tijera fina y se colocan en una placa de cultivo con H<sub>2</sub>O estéril. Este procedimiento se repite por segmentos cada aproximadamente 1,5 cm. Seguidamente, los tendones así obtenidos se disgregan y al mismo tiempo se remueven los vasos sanguíneos y cualquier otro tipo de tejido conectivo que haya quedado adherido al tendón. Posteriormente, para solubilizar el colágeno, se añaden 150mL de ácido acético al 0,1% por cada gramo de tendón obtenido y se dejan en agitación durante

5 días a 4°C. Los tendones disueltos son centrifugados en condiciones de esterilidad, en tubos de centrifuga (Screw-capped Oak Ridge, Beckman) a 12.000g durante 1 hora (Sorval SS-34 Rotor), se recoge el sobrenadante y este extracto ácido es dializado en tubos de diálisis contra 50 volúmenes de H<sub>2</sub>O estéril durante 18 horas a 4°C; transcurrido este tiempo se recupera la solución de colágeno de la bolsa de diálisis, se comprueba su esterilidad y se realizan alicuotas que pueden ser almacenadas por 2 meses a 4°C.

Para el recubrimiento de las superficies de cultivo previamente tratadas con Poli-L-Lisina, se añade una solución 1:20 en ácido acético. Esta solución se deja evaporar completamente a TA, originando así un recubrimiento grueso de colágeno. Las placas se dejan secar completamente durante, al menos 2 días, antes de ser utilizadas para el establecimiento de cultivos neuronales.

### Matrigel

Utilizado como sustrato para el establecimiento del cultivo siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Matrigel™ (BD Bioscience), es una preparación de membrana basal solubilizada extraída del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), un tumor rico en proteínas de matriz extracelular (MEC) que también contiene factores de crecimiento procedentes de forma natural del tumor EHS. Se utiliza una dilución 1:40 en HBSS (Hank's Balanced Salt Solution sin rojo fenol, Gibco®-Invitrogen).

Se añade una dilución 1:40 de Matrigel sobre las placas a tratar y se incuba a TA durante 1 hora. Tras retirar el exceso de Matrigel, las placas se lavan tres veces con agua MilliQ estéril y las placas se dejan secar completamente, al menos durante 1 día a TA, pudiéndose almacenar para su uso posterior a 4°C.

### Fibronectina

La fibronectina (Gibco®-Invitrogen) es una glicoproteína dimérica presente en ECM



que está formada por dos sub-unidades unidas entre sí mediante puentes disulfuro situados cerca del extremo carboxilo donde cada unidad esta compuesta por una serie de dominios funcionalmente distintos; un dominio se une al colágeno, otro a la heparina, y otros a receptores específicos de superficie de varios tipos celulares. Forman fibrillas en la superficie de ciertas células pues requieren para su formación proteínas complementarias, especialmente las integrinas que reconocen la fibronectina ( $\alpha 5 \beta 1$ ). Es utilizada como sustrato para el establecimiento del cultivo siguiendo las indicaciones de la casa comercial a una concentración de 25  $\mu\text{g/mL}$  diluida en MEM. Para tratar las placas de cultivos se utiliza dilución 1:40 de fibronectina y se incuba a TA durante 1 hora. Tras retirar el exceso de sustrato, las placas se lavan dos veces con agua MilliQ estéril y las placas se dejan secar completamente al menos durante 1 día a TA. Una vez que las placas están secas se pueden conservar a 4°C.

### Laminina

Es una glicoproteína que forma parte de la lámina basal y tiene como función el anclaje de células a la lámina basal, pues tiene sitios de unión para integrinas ( $\alpha 6 \beta 1$ ). Para su uso como sustrato en el establecimiento del cultivo se siguen las indicaciones de la casa comercial a una concentración de 25  $\mu\text{g/mL}$  en HBSS. Se añade una dilución 1:40 de Laminina sobre las placas de cultivo a tratar y se incuba a TA durante 1 hora. Tras retirar el exceso, las placas se lavan dos veces con agua MilliQ estéril y las placas se dejan secar completamente al menos durante 1 día a TA; las placas tratadas con laminina se pueden conservar a 4°C.

### **Cocultivos mielinizantes de neuronas DRGNs y SCs**

Los cultivos conjuntos de neuronas y células de Schwann fueron establecidos de acuerdo con métodos descritos en [27]. Los cultivos de neuronas de ganglio de raíz dorsal (DRGNs)

se establecieron a partir de embriones de ratas Wistar (producidas en el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas, IIB) en estadio gestacional E16. Los embriones son aislados en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar horizontal y son procesados hasta la exposición de la médula espinal. De la médula aislada se obtienen los ganglios raquídeos, situados por pares a ambos lados de la misma.

Tras su disociación por métodos químicos (45 minutos a 37°C en Tripsina-EDTA 0,25%, Gibco®-Invitrogen) y mecánicos (mediante varias pasadas por pipeta Pasteur estrechada con calor), son sembradas en placas Falcon pretratadas de 6 pocillos. Para los experimentos de inmunofluorescencia, las células se sembraron sobre cristales cubreobjeto de 25 mm de diámetro (VWR), previamente limpiados con ácido nítrico y tratados con los mismos sustratos. El crecimiento de las células se lleva a cabo en medio M1, en incubador a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Para la purificación de las neuronas y eliminación de células acompañantes se llevaron a cabo 2-3 ciclos alternos con antimitóticos (E2F) y medio de crecimiento M1. Las células se mantienen entre 15-20 días antes de agregar las SCs, para permitir la formación de una extensa red axonal.

Las SCs se obtienen a partir de nervio ciático de crías de rata Wistar de entre 2 y 5 días de edad siguiendo los métodos descritos en [27]. Tras su disociación química (digestión de 15 minutos con colagenasa A [Roche] a una concentración de 3 mg/ml seguida de otros 15 minutos de digestión en colagenasa más Tripsina-EDTA 0,025% [Gibco]) y posterior trituración mecánica, son pasadas por un colador de 70  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Falcon) y sembradas en placas de cultivo Falcon (P35 o P60, en función del número de nervios procesados). Las células contaminantes son eliminadas por un ciclo de antimitótico (AraC, 25  $\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich). Las células se recuperan tratando con un mínimo de dos





ciclos en medio libre de antimetabólicos (DMEM/FBS H.I.). Tras ello, las células son levantadas con tripsina y se siembran sobre el cultivo de neuronas, estableciéndose así el cocultivo, o se pasan a una nueva placa recubierta con Poli-L-Lisina para su posterior expansión.

En caso necesario, si la pureza obtenida mediante el uso de antibióticos no es la adecuada, se procede a un paso de inmunodepleción selectiva de fibroblastos, usando el anticuerpo Thy 1.1 (Sigma-Aldrich) y Complemento (Sigma-Aldrich). Para ello, las SCs se deben resuspender en 1 mL de DMEM/FBS, añadiéndose una dilución 1:1000 del anticuerpo contra Thy 1.1, que se une de forma específica a los fibroblastos, procediéndose a su incubación durante 30 min a 37°C. Tras eliminar el medio por centrifugación, se vuelven a resuspender las células en 1 mL de DMEM/FBS al que se le añadió una dilución 1:8 de complemento de suero de conejo (Sigma-Aldrich), incubando nuevamente durante otros 30 min a 37°C. Tras la eliminación del exceso de complemento mediante centrifugación, las células están listas para ser utilizadas.

La siembra y los primeros días de proliferación se llevan a cabo en medio DMEM/F-12. Tras un periodo de 7-10 días en el cual las SC proliferan, migran y se sitúan sobre los axones recubriéndolos totalmente, se procede a la adición de ácido ascórbico a una concentración de 50 µg/ml (Ácido L-Ascórbico, Sigma-Aldrich), esencial para la formación de la lámina basal, etapa previa a la aparición de la envuelta de mielina. De forma habitual, en este momento también se inician los tratamientos que, junto con el ácido ascórbico, serán renovados cada dos-tres días durante un periodo de entre 5 y 10 días, según el experimento, como se observa en el esquema (Figura M1).

La producción, mantenimiento y el sacrificio de los animales fue realizado en concordancia con las normativas europeas vigentes en cuestiones de ética en animales de experimentación (recogidas en el RD 1201/2005).

## Cultivos de SCs

La extracción de SCs se realiza de acuerdo al método descrito anteriormente [27]. Tras la eliminación de otras células contaminantes, las SCs son levantadas de la placa químicamente mediante el uso de tripsina-EDTA 0,05% o TrypLE™ Express (Gibco®-Invitrogen) y sembradas en placas Falcon P-100 previamente tratadas con poli-L-Lisina. Para su mantenimiento y expansión se utiliza el medio DMEM/FBS H.I., suplementado con 2 µM de Forskolina (Calbiochem) y 50 µg/ml de BPE (Gibco®-Invitrogen). Las células pueden almacenarse a -80°C o en nitrógeno líquido (para mayor tiempo de preservación), utilizando el mismo suero usado en el crecimiento de cada línea suplementado con un 10% de DMSO (Sigma-Aldrich).

## Cocultivos mielinizantes en medio NB

En algunos casos, se utilizó un método alternativo de formación de cocultivos mielinizantes en ausencia de suero similar al descrito por Zhang y colaboradores, salvo por ciertas variaciones [186].

Neuronas sensoriales obtenidas como en el método anterior, se añaden sobre cristales cubreobjeto tratadas con Poli-L-Lisina/ Colágeno en placas multipocillos Falcon de 6 pocillos.

El cultivo se realiza desde el inicio en medio NB + NGF 100ng/mL. Una vez concluido el tiempo del cultivo de DRGs (tres semanas) y el establecimiento del cocultivo con la adición de las células de Schwann, se esperan otras dos semanas para permitir que proliferen las SCs (en vez de una semana que es lo habitual en nuestro protocolo de cocultivo), se lava el cocultivo con PBS para eliminar el NGF del medio y se comienza la inducción de la formación de la membrana basal añadiendo ácido ascórbico y el tratamiento con los factores y/o suero durante dos semanas más, antes de proceder al análisis de la formación de mielina mediante inmunohistoquímica. A partir de la inducción de formación de mielina llevada





a cabo en el momento de adición de ácido ascórbico aquellas placas donde se realizó la comparación entre GDNF y PSPN con respecto a situaciones de formación de internodos con o sin NGF, se realizaron en ausencia total tanto de suero como de suplemento B27.

## **Análisis de las Muestras**

### **PCR Cuantitativa a Tiempo Real**

La extracción de mRNA se realizó con TRI@Reagent (Sigma), de acuerdo a las especificaciones del comerciante y fueron cuantificadas mediante espectrofotometría (Nanodrop™, Thermo Scientific). Para la síntesis de cDNA se utilizó un kit (iScript cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Cuando fue posible (todos los casos menos para GDNF), el diseño de los oligonucleótidos se realizó atravesando dos exones consecutivos para evitar posibles interferencias por contaminaciones con DNA genómico. Todas las muestras fueron tratadas con DNAsa antes de la síntesis del cDNA. Los programas utilizados para el diseño fueron MacVector Suite (<http://www.macvector.com/>) en conjunción con Amplify software (<http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/>). Todos los oligonucleótidos utilizados fueron confirmados mediante RT-PCR convencional (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad) con la finalidad de observar si producían un único amplicón del tamaño adecuado, seguido por una PCR Cuantitativa a Tiempo Real (qPCR) que permitiera descartar la presencia de dímeros de cebadores. Las secuencias de oligonucleótidos con las que se detectaron los genes se muestran en la Tabla M1.

### **Reacción qPCR**

El equipo utilizado para dicho análisis es el MxPro-Mx3005P® (Stratagene); la determinación de niveles de los genes de interés se realizó con SYBR Green (FastStart Universal SYBR Green Master, Roche) según condiciones indicadas en la tabla M2.

Oligo-nucleótidos	Orientación	Secuencia (5'—3')
<b>GDNF</b>	Sentido	GTT ATG GGA TGT CGT GGC TGT C
	Antisentido	CGC TTG TTT ATC TGG TGA CCT TTT C
<b>NRTN</b>	Sentido	GGA GGG TCT GCT CTT GGG TCA C
	Antisentido	CCA GGT CGT AGA TGC GTA TGG C
<b>ARTN</b>	Sentido	AAG CGA TGG AAC TGG GAC TTG
	Antisentido	GCT GCG GGA CAT TGG GTC
<b>PSPN</b>	Sentido	GCT CTC ATC TGG GAA AAT GGC
	Antisentido	GTA AGG CTC TTG GAA GGC GG
<b>GFRa1</b>	Sentido	GCG GCT TTG GAT TTT GGG
	Antisentido	CAG GCT GAA GTT GGT TTC CTT G
<b>GFRa2</b>	Sentido	GCA TTG GAT TTG GGG GTC G
	Antisentido	GCG GAG GGT TTC GTC TAA AAA G
<b>GFRa3</b>	Sentido	TGT CCG AAG CCT TGG TGACTAC
	Antisentido	GAT TCA TTT TCC AGG GTT TGC TG
<b>GFRa4</b>	Sentido	CAC CGT GGT CAC CCC CAA C
	Antisentido	GCT GTC AAA GGC TTG TAT GGC AC
<b>RET</b>	Sentido	TGC TTA CTG GGA GAG GCT GTA TG
	Antisentido	TGG GAA GGT GTC GTT GAT GAA G
<b>NCAM</b>	Sentido	AAG GAG AAA TCA GCG TTG GAG AG
	Antisentido	CGT TGT AGA TGG TGA GGG TAG AGG
<b>MAG</b>	Sentido	TTC CAG GGA GCA CAC CGA C
	Antisentido	TGT AGC AGA CAA TGG CAA TCA GG



Oligo-nucleótidos	Orientación	Secuencia (5'—3')
MPZ	Sentido	CTG TTG CTG CTG TTG CTC TTC TAC
	Antisentido	TGG TGC TTC GGC TGT GGT C
MBP	Sentido	CGG GCA TCC TTG ACT CCA TC
	Antisentido	GAC TAC TGG GTT TTC ATC TTG GGT C
Brn2	Sentido	GCA GCC CCA CCA GCA TAG AC
	Antisentido	CCA GAG CCC CCT TGA CGC
Sox10	Sentido	CCC TCC CTC CCA GTC CAT C
	Antisentido	CGT GAA GAG CCC AAC GCC
Oct6	Sentido	GGT GGT GGC TCG TCG GTG
	Antisentido	GTT GCT TGA ACT GCT TGG CG
Krox20	Sentido	TGC CTG ACA GCC TCT ACC CG
	Antisentido	TCT CCA GCC ACT CCG TTC ATC
cJun	Sentido	CGA GGA AAT AGG CGA GCG G
	Antisentido	GTG AGG GGG AGG GGG ACG
Sox2	Sentido	TGG TTA CCT CTT CCT CCC ACT CC
	Antisentido	ATC TCT CCC CTT CTC CAG TTC G
18S rRNA	Sentido	GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT
	Antisentido	CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG
CypA	Sentido	TGG CAA ATG CTG GAC CAAAC
	Antisentido	TTC CTG GAC CCA AAA CGC TC

**Tabla M1.** Secuencia de oligonucleótidos.

El análisis de datos de las qPCR se realizó mediante el método de la  $\Delta\Delta C_t$ , utilizando como normalizador el promedio entre los genes CypA y 18S, refiriendo todos los valores a sus respectivos controles.

Para cada punto existen duplicados técnicos, considerando como  $C_t$  para esa muestra el valor medio obtenido. Los datos se muestran como la media  $\pm$  desviación estándar de los valores de  $2\Delta\Delta C_t$  de las diferentes réplicas experimentales.

	Nº Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo
<b>Segmento 1</b>	1	95°C	10'
<b>Segmento 2</b>	40	95°C	30''
		60°C	1'
<b>Segmento 3</b>	1	95°C	1'
		55°C	30''
		95°C	30''

**Tabla M2.** Condiciones de las reacciones de amplificación por qPCR.

## Inmunofluorescencia

### Soluciones y Anticuerpos

#### Tampones

Tampón ABS (Antibody Blocking Solution): 150 mM de NaCl (Merck), 50 mM de Trizma® Base (Sigma-Aldrich), 1% de BSA, 100 mM L-Lisina (Sigma-Aldrich), con el pH ajustado a 7,4.

Tampón PBS (Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>): Tampón PBS suplementado con 0,5 mM de CaCl<sub>2</sub> y 0,9 mM de MgCl<sub>2</sub>.

#### Anticuerpos primarios

MAG (anticuerpo monoclonal de ratón): Anti-Glicoproteína Asociada a Mielina (1:500, Chemicon).

MBP (anticuerpo policlonal de conejo): Anti-Proteína Básica de Mielina (1:500, Chemicon).  
P0 (anticuerpo monoclonal de ratón):



Proteína de mielina cero (1:500, Astexx).  
NF200 (anticuerpo policlonal de conejo):  
Neurofilamento (1:500, Dako).

### Anticuerpos secundarios

Anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor®-488 (Invitrogen).  
anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor®-546 (Invitrogen).

### Análisis por Inmunofluorescencia

Después de fijar los cocultivos con paraformaldehído (Fluka) al 4%, éstos fueron permeabilizados y bloqueados en tampón ABS en presencia de 0,1% Triton X-100 y 10% de suero de cabra (ambos de Sigma-Aldrich). Los anticuerpos primarios utilizados fueron incubados durante 16-24 horas a 4°C. Los anticuerpos secundarios se utilizaron a una dilución de 1:2000 con incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. El montaje de los cristales y tñido de los núcleos se realizó con Pro-Long® Gold antifade con DAPI (Invitrogen).

Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia Nikon 90i, acoplado a cámara Nikon FIQIMc. Las mediciones del número de internodos de mielina se realizaron mediante el software de análisis NisElements 3.01 de Nikon, y el tratamiento de las imágenes se realizó en ImageJ 1.40g ([http://rsb.info.nih.gov/ij/java1.5.0\\_16](http://rsb.info.nih.gov/ij/java1.5.0_16)) y Photoshop 10.0.1. Para la observación de las muestras también se utilizó en algunas ocasiones el microscopio confocal espectral TCS SP5 Leica o el microscopio confocal espectral LSM710 (Zeiss). Las distintas capas se proyectaron en el eje Z mediante ImageJ.

### Determinación del Índice de Mielina

En algunas ocasiones, se determinó el grado de mielinización, recubrimiento axonal o superficie axonal total mediante la determinación del porcentaje del campo que presenta inmunoreactividad positiva para un determinado anticuerpo (P0 o MBP, MAG o NF200, respectivamente).

En todos los casos, tras identificar y separar las diferentes capas de color y eliminar el ruido de fondo de forma homogénea en las distintas imágenes a comparar, se determinó el número de píxeles que presentaban inmunoreactividad positiva para dicho anticuerpo, calculándose el dato como el porcentaje de superficie cubierta o índice de mielina, de recubrimiento o axonal.

### **Ensayos de Migración**

Para los estudios de migración, las SCs se adaptaron previamente durante 48h con DM suplementado con FBS-H.I. al 10% [109]. El sembrado de las células se realizó en placas multipocillos de 24 pocillos (Falcon) recubiertas con Poli-L-lisina mediante la adición de  $1 \times 10^5$  células en una gota de 30  $\mu$ l en DM suplementado con 10% de FBS H.I. Tras dejar que las células se adhirieran a la placa (1-2 horas), el pocillo se inundó mediante la adición de 200  $\mu$ l DM. Al día siguiente (16-24 horas posteriores al sembrado de las células), las células se pasaron a las condiciones de medio establecidas para el ensayo (DM no suplementado con suero). Tras proceder a realizar una herida con punta p200, se lavaron dos veces los pocillos con medio para quitar las células sueltas y se añadieron los distintos tratamientos a una concentración de 25 ng/mL de GFLs en medio definido. En algunas ocasiones, los ensayos se realizaron en presencia de suero, en cuyo caso se añadió un 10% de FBS H.I. a aquellos pocillos requeridos. Algunos ensayos de migración se realizaron en presencia de Afidicolina (1  $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich) que es un inhibidor reversible de la replicación de ADN nuclear eucariótico; que actúa bloqueando la fase S de proceso de realización.

La monitorización del cierre de la herida o la invasión de la brecha se realizó mediante un microscopio Nikon Eclipse TS100, acoplado a una cámara Nikon DSL1 o en el microscopio CellObserver® z1 (Zeiss) acoplado a una cámara Cascade 1k (Photometrics), este microscopio cuenta con un sistema de



incubación con CO<sub>2</sub> y mantiene la temperatura a 37°C, permitiendo adquirir imágenes cada 5 min a 40x aumentos en condiciones adecuadas para las células. La adquisición se realizó utilizando el software Axiovision 4.8. El tratamiento de las imágenes se realizó mediante el programa Photoshop 10.0.1. e ImageJ; para el análisis de progresión de la migración se utilizó el programa TScrath.

### **Ensayos de Proliferación (Cristal Violeta)**

En este ensayo se utilizan placas multipocillos Falcon de 24 pocillos tratadas con Poli-L-Lisina o Matrigel, en las cuales se sembraron 5x10<sup>4</sup> SCs/pocillo. Al día siguiente, se trataron con GFLs durante los tiempos indicados. Una vez concluido el tiempo del cultivo celular, se decantó el medio y se agregó a cada pocillo una solución de glutaraldehído (con la finalidad de fijar a las células) al 1 % en PBS 1x, pH 7.4 durante 15 min. El glutaraldehído fue retirado y las células se lavaron ligeramente con PBS 1x, evitando desprenderlas. Las placas se dejaron secar a TA durante 16 horas aproximadamente. Se agregó a las placas una solución de cristal violeta al 0,1%, manteniéndose en agitación suave durante 30 min. Las células se lavaron exhaustivamente con agua para retirar completamente el exceso de colorante no incorporado, tras lo cual se dejó secar las placas a temperatura ambiente. Para la evaluación se agregaron a las células 1 ml de una solución de ácido acético al 10 %

durante 20 min. para solubilizar el colorante incorporado, determinándose la absorbancia a 595 nm. Las absorbancias obtenidas se grafican en todos los casos como la media  $\pm$  desviación estándar con respecto a los cultivos no tratados [63].

### **Análisis de datos y procedimientos estadísticos**

Todos los experimentos fueron repetidos un mínimo de dos veces con resultados similares. En las representaciones gráficas de resultados, se muestra la media  $\pm$  la desviación estándar o el error estándar de la media (SEM), según se indica en cada caso.

Para representar diferencias significativas entre grupos se utilizó la prueba t de Student de una cola para muestras desapareadas. Se consideró la diferencia como estadísticamente significativa cuando se obtuvo un valor de  $p \leq 0,05$ . En las representaciones gráficas de las diferentes figuras se han considerado tres niveles de significación para valores de  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) y  $p \leq 0,001$  (\*\*\*).

Habitualmente se muestran resultados representativos, mientras que en algunos casos (análisis del efecto de los distintos inhibidores de las rutas de NCAM y Ret sobre la formación de mielina), se han agrupado los resultados de distintos experimentos una vez se ha procedido a la normalización de los resultados obtenidos, considerando como valor 100 el observado en las condiciones control para el número de figuras MAG+.



## RESULTADOS

En las últimas décadas, se ha generado gran interés en dilucidar los mecanismos de regulación de la formación de mielina debido a sus implicaciones potenciales en distintas neuropatías. Una de las imágenes emergentes de los últimos años es que los principales agentes responsables de dicha regulación son factores previamente caracterizados por su actividad neurotrófica. Además de las neurotrofinas, el principal grupo de factores neurotróficos capaz de afectar a las neuronas sensoriales es el constituido por los GFLs, originalmente identificados como factores tróficos implicados en la supervivencia y diferenciación morfológica de neuronas dopaminérgicas. Es por ello que nos propusimos analizar su posible implicación como reguladores del proceso de mielinización periférica.

### Niveles de Expresión de GFLs, Co-receptores y Receptores de GFLs *in vivo*

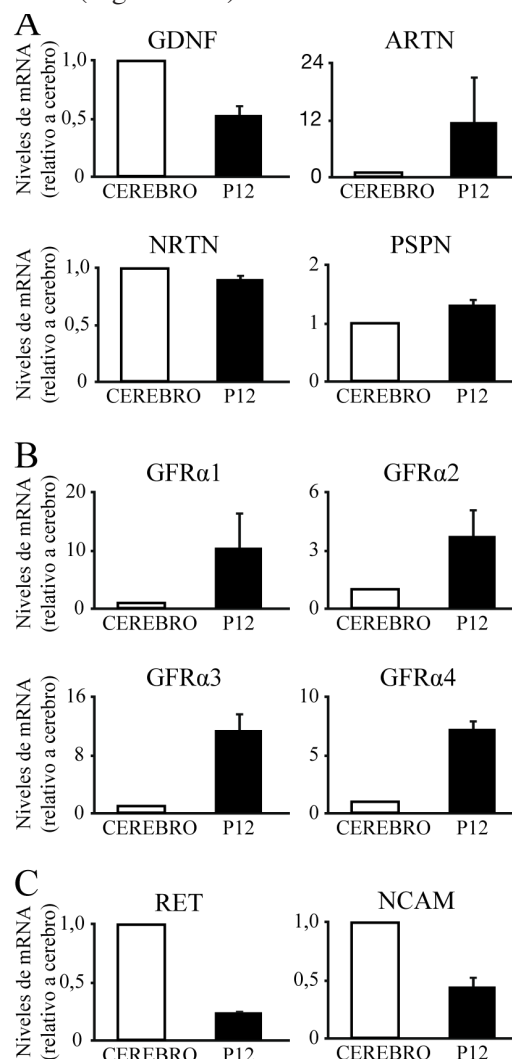
Un primer requisito que debe cumplir un agente para poder actuar como regulador de la mielinización periférica es el de expresarse durante las etapas claves en las que este proceso transcurre. Por ello, se analizaron los niveles de expresión de los distintos ligandos, receptores funcionales señalizantes y co-receptores específicos durante el desarrollo del nervio ciático en ratas, aprovechándose del hecho de que esta especie desarrolla la formación de mielina en una etapa inmediatamente posterior a su nacimiento.

#### **Expresión de GFLs, Receptores y Co-receptores en Nervio Ciático**

Para evaluar la posible implicación de los factores asociados a la familia de GDNF en la mielinización periférica, se analizó el nivel de expresión de los mismos en muestras de nervio ciático de estadio postnatal 12 (P12), momento en el que se está produciendo una síntesis activa de mielina, mediante RT-qPCR, comparando los niveles obtenidos con los

existentes en cerebro de rata adulta, en la que esta familia de factores neurotróficos juega un destacado papel funcional.

Los cuatro ligandos de esta familia, GDNF, ARTN, NRTN y PSPN se expresan en esta etapa intermedia de la mielinización del nervio ciático a niveles comparables e incluso superiores a los obtenidos en cerebro de rata adulta (Figura R1A).



**Figura R1. Todos los GFLs, sus receptores y co-receptores se expresan en el nervio ciático.**

La expresión en el nervio ciático de ratas jóvenes en estadio P12 de (A) los cuatro ligandos de la familia del GDNF, (B) sus co-receptores específicos y (C) los receptores de señalización Ret y NCAM se analizaron mediante RT-Q-PCR. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  s.d. tomando como punto de referencia los niveles de expresión en cerebro de rata adulta.



Igualmente, los distintos receptores y co-receptores pueden ser detectados en nervio ciático (Figura R1B-C). Resulta especialmente interesante la presencia de niveles relativamente muy elevados de todos los co-receptores de GFLs (GFR $\alpha$ 1- $\alpha$ 4).

Estos resultados sugieren que la señalización por GFLs pudiera estar jugando algún papel en el desarrollo del nervio ciático durante las etapas claves de la mielinización.

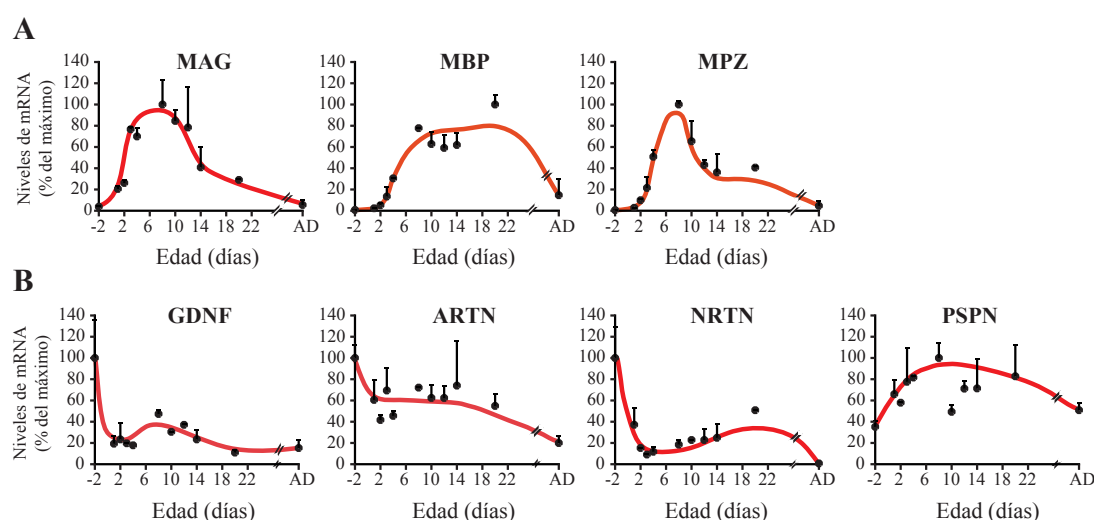
### Curso temporal de expresión de GFLs durante el desarrollo del nervio ciático

Otra de las características generales de los distintos ejes de señalización que actúan durante la mielinización periférica y han podido ser caracterizados de forma más exhaustivamente es la de su regulación temporal durante todo el proceso. Asimismo, como el proceso de mielinización periférica se caracteriza por la presencia de distintas etapas (premielinización, síntesis activa de mielina y finalización del proceso/mantenimiento de la mielina madura), la posible regulación de estos ligandos y, sobre todo, sus receptores y

co-receptores, podrían aportarnos alguna pista de su posible funcionalidad.

Para ello, analizamos el perfil de expresión de los distintos factores a lo largo del desarrollo del nervio ciático desde etapas prenatales en las que la formación de mielina todavía no se ha iniciado, hasta la tercera semana postnatal, en la que el proceso de mielinización se encuentra ya muy avanzado, como puede deducirse de los perfiles de expresión de MAG, MBP y MPZ, tres genes que codifican por algunas de las principales proteínas de mielina, así como en animal adulto (Figura R2A).

Con respecto a la curva de progresión temporal de expresión de los GFLs, se observó que GDNF, ARTN y NRTN presentaron un perfil similar, partiendo de un nivel de expresión máximo durante estadios embrionarios, que comienza a decrecer a partir del nacimiento, manteniéndose más o menos estable durante todo el proceso de mielinización para alcanzar los niveles más bajos ya en la etapa adulta (Figura R2B).



**Figura R2. Los niveles de expresión de los distintos GFLs se modulan durante el desarrollo del nervio ciático.** (A) Perfil temporal de expresión de las principales proteínas de mielina durante el desarrollo del nervio ciático a partir del estadio E18 (día -2) analizados mediante RT-Q-PCR. (B) Curso temporal de la expresión de GDNF, ARTN, NRTN y PSPN determinada mediante RT-Q-PCR. En todos los casos los valores se muestran como la media  $\pm$  s.d. relativizado al máximo de expresión obtenido para cada gen. AD: adulto.





Curiosamente, PSPN presenta un perfil de expresión distinto con un máximo relativo dentro de los tiempos analizados en P8 y un ligero descenso posterior, aunque manteniendo niveles de expresión bastante comparables hasta el nivel adulto (Figura R2B).

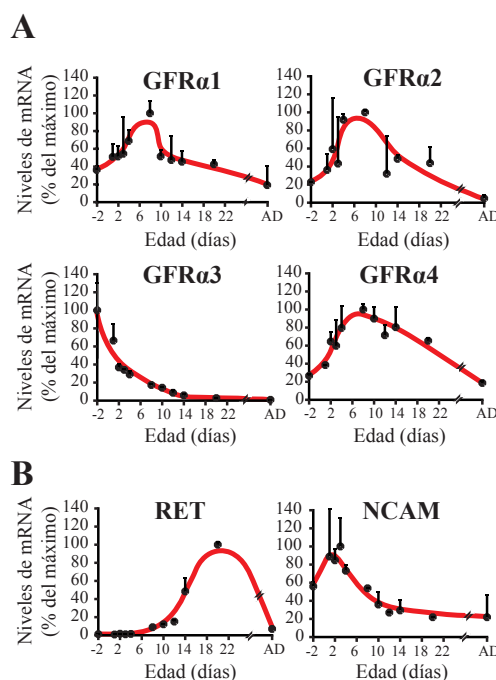
### Niveles de expresión de co-receptores y receptores de GFLs durante el desarrollo del nervio ciático

Los co-receptores y receptores de los GFLs se regulan durante el proceso de mielinización del nervio, aunque con comportamientos marcadamente diferentes. Por un lado, los niveles de co-receptores GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2 y GFR $\alpha$ 4 van aumentando durante las etapas iniciales, presentando máximos niveles de expresión durante el estadio postnatal 8 (Figura R3A), lo que representa un perfil muy similar al observado con los genes de mielina (ver Figura R2A), con un pico aproximado coincidiendo con el momento de deposición máxima de mielina (Figura R3A). Con respecto a GFR $\alpha$ 3, el nivel máximo de expresión obtenido se observa en estadio embrionario y va descendiendo paulatinamente hasta el adulto (Figura R3A).

Por su parte, dentro de los receptores señalizadores, los niveles de expresión de Ret durante el desarrollo del nervio ciático van aumentando partiendo de niveles muy bajos en estadios embrionarios para alcanzar un nivel de máxima expresión en estadio postnatal 20 (P20), el último tiempo analizado durante el desarrollo, aunque posteriormente vuelven a decaer en el animal adulto (Figura R3B). Por el contrario, el receptor NCAM, alcanza su máxima expresión en etapas justo posteriores al nacimiento, para ir sufriendo una ligera disminución, alcanzando aproximadamente a los 10 días su nivel más bajo (Figura R3B).

Este grupo de resultados sugiere que los distintos GFLs podrían estar participando en el desarrollo del nervio ciático y, más concretamente, en el proceso de mielinización

que tiene lugar durante las primeras semanas de la vida postnatal.



**Figura R3. Los niveles de expresión de los distintos receptores y co-receptores de GFLs se modulan durante el desarrollo del nervio ciático.** (A) Perfil temporal de expresión de la familia GFR $\alpha$  de co-receptores de GFLs durante el desarrollo y maduración del nervio ciático a partir del estadio prenatal E18 (día -2) analizados mediante RT-Q-PCR. (B) Curso temporal de la expresión de los niveles de receptores de señalización Ret y NCAM durante el desarrollo del nervio ciático. En todos los casos los valores se muestran como la media  $\pm$  s.d. relativizado al máximo de expresión obtenido para cada gen. AD: adulto.

### Expresión de los distintos GFLs, receptores y co-receptores *in vitro*

Los resultados mencionados en el apartado anterior, indican que los distintos GFLs, sus receptores y co-receptores se expresan en el nervio ciático durante las etapas claves del proceso de mielinización. En cualquier caso, el nervio es una estructura compleja en la que participan distintos tipos celulares (principalmente las células de Schwann, pero también los axones neuronales y otras células acompañantes, esencialmente fibroblastos). Con objeto de intentar determinar qué tipo o tipos celulares en concreto eran los responsables

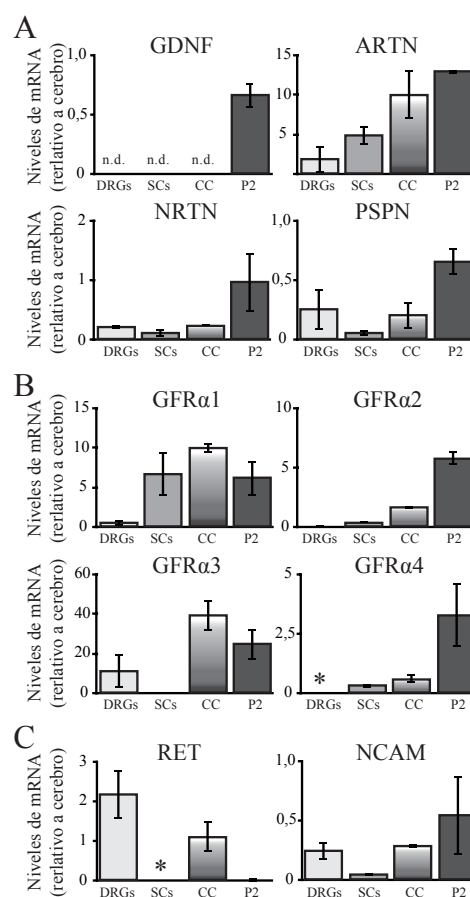


de los niveles de expresión encontrado en el nervio ciático, se analizó por RT-Q-PCR el nivel de mRNA presente en células de Schwann purificadas, así como en neuronas sensoriales DRG aisladas, comparando estos resultados con los obtenidos en cocultivos mielinizantes en el que ambos tipos celulares están presentes en la etapa previa a la inducción de la mielinización.

Los GFLs se encuentran expresados en los distintos tipos celulares objeto a estudio, los niveles de GDNF no fueron detectables (Figura R4A). Los co-receptores, al igual que ocurría con sus perfiles de expresión en nervio ciático, pueden agruparse en dos subgrupos. En primer lugar nos encontramos con los co-receptores  $GFR\alpha1$ ,  $\alpha2$  y  $\alpha4$ , que también tenían un perfil temporal de expresión similar en nervio ciático, y que presentan un mayor nivel de expresión en SCs que en DRGs aisladas. Esto es especialmente significativo en el caso de  $GFR\alpha4$ , que resulta totalmente indetectable en neuronas. Por otro lado,  $GFR\alpha3$  (que presentaba un perfil de expresión en nervio ciático diferente al resto de la familia) se expresa mayoritariamente en neuronas, presentando unos niveles muy bajos (aunque todavía débilmente detectables) en SCs. De forma destacable, los niveles observados en co-cultivos en los que ambos tipos celulares están interaccionando, son incluso mayores que los obtenidos en cualquiera de los tipos celulares aislados, aproximándose bastante a los valores presentes en la estadio postnatal P2, que puede en cierta medida asimilarse al grado de maduración de los cocultivos (Figura R4B).

Sorprendentemente, la expresión de Ret (el receptor canónico por el que señalizan los distintos GFLs) es muy alta en neuronas DRG e indetectable en células de Schwann, presentando un valor intermedio en cocultivos (lo que indicaría la ausencia de regulación cruzada entre estos tipos celulares en cuanto a su expresión). Como pudiera esperarse, considerando que la mayor parte del mRNA presente en los nervios ciáticos ha de proceder

de las células de Schwann y no del componente axonal, los niveles observados en neuronas aisladas o cocultivos son incluso más elevados que los existentes en nervio ciático (Figura R4C). Finalmente, NCAM, el otro receptor por el que pueden señalizar los distintos GFLs, se encuentra presente tanto en neuronas como en SCs aisladas, a niveles relativamente comparables con los obtenidos en cocultivos o nervios ciáticos.



**Figura R4. Niveles de expresión de ligandos, co-receptores y receptores de GFLs en DRGs, SCs, Cocultivos y Nervios Ciáticos (P2).** La expresión de (A) los distintos ligandos, (B) sus co-receptores y (C) los receptores de señalización de la familia de los GFLs fue analizada mediante RT-Q-PCR tanto en SCs y DRGs de forma individual, como en cocultivos (CC) justo antes de inducir la mielinización (día 0), comparándolo con los niveles observados en nervio ciático de ratas en estadio P2. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  s.d. tomando como punto de referencia los niveles de expresión en cerebro de rata adulta. Los asteriscos representan niveles no detectables. n.d.: no determinado.





## Regulación del Proceso de Mielinización por GFLs

Una vez hemos comprobado que los distintos GFLs y sus receptores se expresan durante el proceso de mielinización, procedimos a utilizar un sistema de cocultivos mielinizantes in vitro para intentar determinar si estos factores podían regular dicho proceso.

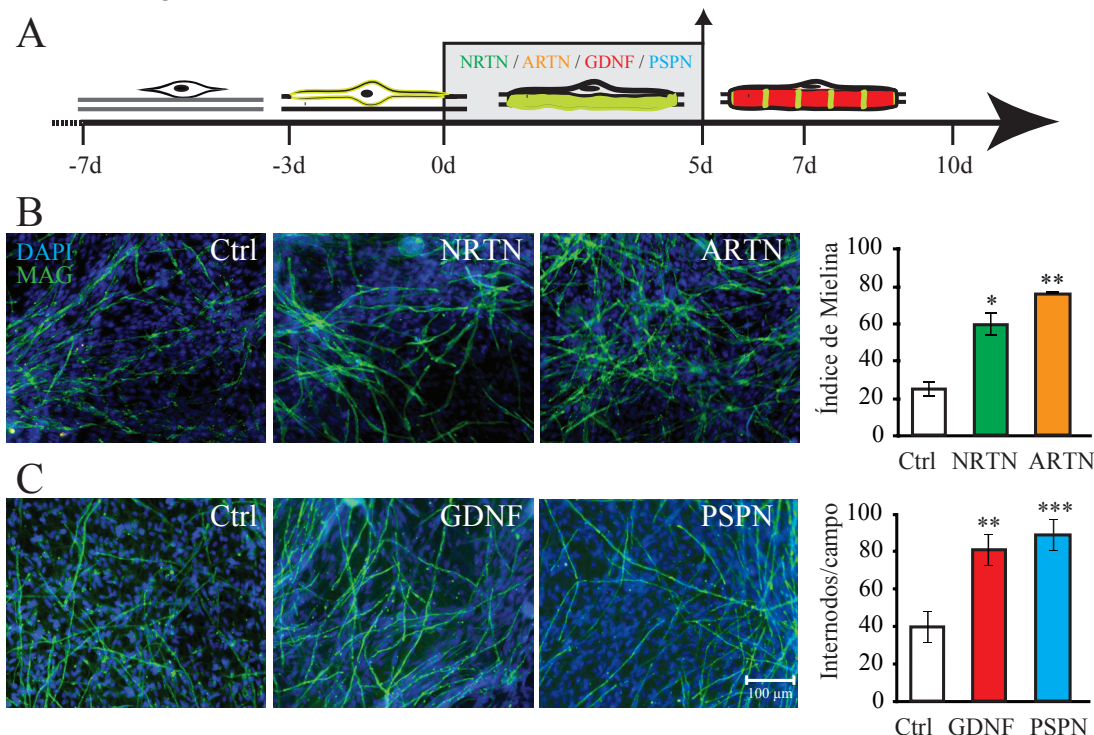
### Incremento del recubrimiento axonal en cocultivos tratados con GFLs

En primer lugar, procedimos a determinar si estos factores eran capaces de actuar en etapas tempranas de la formación de mielina. Para ello, se establecieron cocultivos mielinizantes, que fueron tratados con los distintos GFLs durante 5 días (tiempos cortos de tratamiento) concomitantemente a la inducción de la formación de mielina en los cocultivos, analizando el grado de recubrimiento axonal

e iniciación de la mielinización mediante tinción de inmunofluorescencia contra MAG, lo que nos permite identificar aquellas células de Schwann que, como mínimo, hayan iniciado el proceso de mielinización y se encuentren recubriendo el axón (Figura R5A). El tratamiento con los distintos GFLs durante las etapas iniciales de la formación de mielina in vitro produjo un aumento significativo en el número de figuras de recubrimiento obtenidas con todos ellos (Figura R5B-C).

### Incremento de la formación de internodos de mielina en cocultivos tratados con GFLs

Seguidamente, pasamos a comprobar si estos factores eran capaces de producir no tan sólo un incremento en el recubrimiento axonal o, al menos, si este efecto era capaz de dar lugar a un incremento en la formación de mielina madura. Para ello se trataron cocultivos con



**Figura R5. Efectos de GFLs sobre el recubrimiento axonal y la formación de mielina.** (A) Esquema del curso temporal de los experimentos. Cocultivos mielinizantes de SCs y DRGNs establecidos sobre Matrigel fueron tratados con 25ng/mL de los distintos GFLs concomitantemente al inicio del proceso de mielinización (día 0), analizándose el grado de recubrimiento axonal y/o mielinización 5 días después. (B-C) Grado de recubrimiento en cocultivos tratados con NRTN y ARTN (B) o con GDNF y PSPN (C) analizado mediante microscopía de fluorescencia contra la proteína de mielina MAG (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). En los paneles derechos se muestra la media  $\pm$  SEM del grado de recubrimiento obtenido mediante la determinación del índice de mielina de los cultivos (B) o mediante conteo directo del número de figuras de recubrimiento (C). Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas con  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

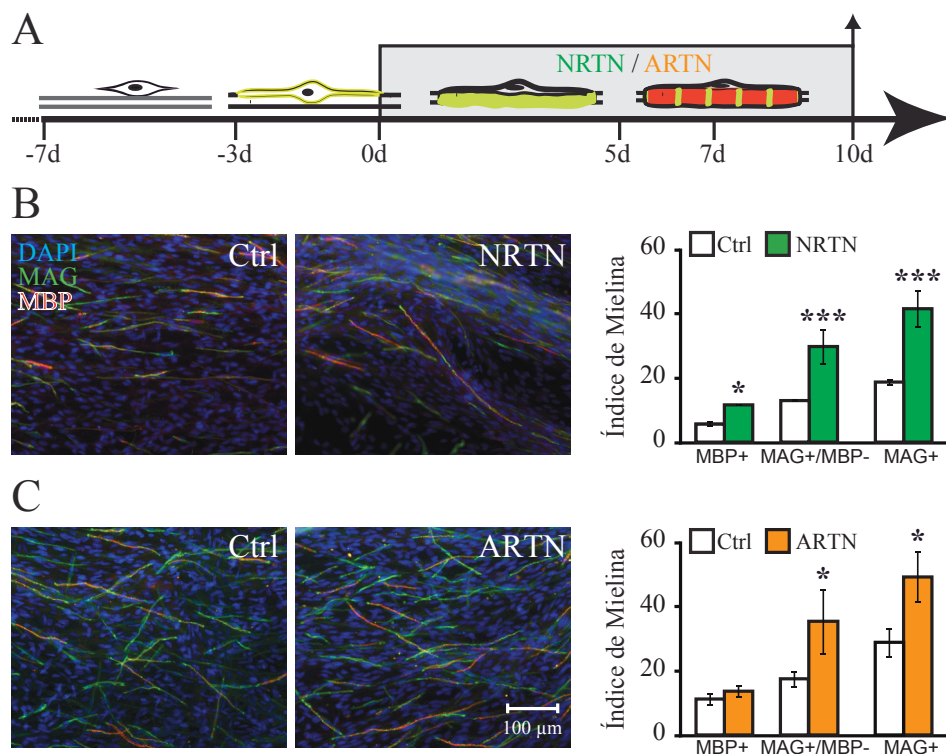


los diferentes GFLs durante diez días (10d), tiempo suficiente para permitir la formación de mielina madura, analizando tanto el número de figuras de recubrimiento axonal mediante tinción con un anticuerpo contra MAG, como la formación de mielina madura como tal, mediante tinción con un anticuerpo contra la proteína de mielina MBP (Figura R6A).

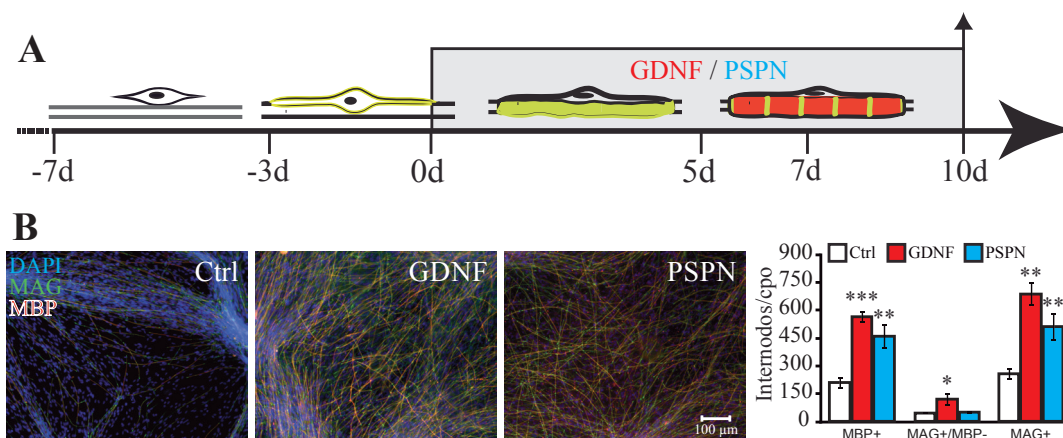
En primer lugar, se observó que tanto NRTN como ARTN fueron capaces de producir un aumento significativo en el número de figuras de recubrimiento axonal (MAG+) tras 10 días en cultivo (Figura R6). Este incremento en el recubrimiento axonal se vio acompañado de un aumento significativo en el número de internodos de mielina maduros (MBP+) obtenidos en aquellos cultivos tratados con NRTN (Figura R6B), no siendo esta diferencia

significativa en el caso de ARTN (Figura R6C), donde sólo se aprecia una leve tendencia positiva.

Por otro lado, tanto GDNF como PSPN fueron capaces de producir un fuerte aumento en el número de figuras de recubrimiento axonal (MAG+) observados tras 10 días en cultivo (Figura R7). En este caso, este incremento en la iniciación de la mielinización se correlaciona con un fuerte incremento en la formación de internodos maduros de mielina (MBP+). Especialmente interesante es el comportamiento de PSPN, en el que prácticamente la totalidad del aumento en las figuras de recubrimiento MAG+ observadas se deben a un incremento en el número de internodos maduros (MBP+), no observándose diferencias en el número de figuras MAG+/-



**Figura R6. Efectos positivos de NRTN y ARTN sobre el recubrimiento axonal y la formación de mielina.** (A) Esquema del curso temporal de los experimentos. (B-C) Cocultivos mielinizantes de células de Schwann y neuronas sensoriales DRG establecidos sobre Matrigel fueron tratados con 25 ng/ml de NRTN (B) o ARTN (C) desde el inicio del proceso de mielinización (día 0), analizándose el grado de mielinización obtenido 10 días después mediante microscopía de inmunofluorescencia, con marcaje de anticuerpos específicos contra las proteínas de mielina MAG (verde) y MBP (rojo), los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). En los paneles derechos se muestra la cuantificación del grado de mielinización y madurez de los cultivos, diferenciándose entre la formación de mielina madura (MBP+) y grado de recubrimiento total de los axones (MAG+), así como las zonas de axón recubiertas sin mielina madura (MAG+/MBP-). Cada punto representa la media  $\pm$  s.d. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas con  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*).



**Figura R7. Efectos positivos de GDNF y PSPN sobre la formación de mielina.** (A) Esquema del curso temporal de los experimentos. (B) Cocultivos mielinizantes de células de Schwann y neuronas sensoriales DRG establecidos sobre Matrigel fueron tratados con 25 ng/ml de GDNF o PSPN desde el inicio del proceso de mielinización (día 0), analizándose el grado de mielinización obtenido 10 días después mediante microscopía confocal, con marcaje de anticuerpos específicos contra las proteínas de mielina MAG (verde) y MBP (rojo), los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). En los paneles derechos se muestra la cuantificación del número de internodos de mielina y grado de maduración de los cultivos, diferenciándose entre figuras de mielina madura (MBP+) y figuras inmaduras en las que sólo se aprecia recubrimiento del axón en ausencia de MBP (MAG+/MBP-), así como el grado total de recubrimiento de los axones (MAG+). Cada punto representa la media  $\pm$  SD. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas con  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

MBP- que, esencialmente, representarían figuras de mielina inmadura.

Debido a estos resultados, se centró el análisis a partir de este momento en el GDNF, (ya que presenta una capacidad mielinogénica similar a NRTN y ARTN, aunque con una mayor eficacia) y PSPN (debido a sus peculiaridades y al hecho de presentar un comportamiento ligeramente diferente al resto de miembros de la familia).

### El Pretratamiento de cocultivos con GDNF y PSPN aumenta su efecto sobre la mielinización

Como se ha observado, los resultados anteriores muestran como GDNF y PSPN influyen de manera positiva sobre el proceso de mielinización en nuestro modelo de cocultivos. Estos efectos se obtienen en cocultivos donde el tratamiento con estos factores se produce paralelamente a la adición del ácido ascórbico (necesario para la formación de la lámina basal), requerimiento esencial para que se inicie la etapa de mielinización que concluye tras la formación de envueltas de mielina madura.

Para determinar si estos factores influyen en etapas previas premielinizantes sobre la decisión de las neuronas de permitir la formación de mielina, se realizaron experimentos donde los cocultivos se pretrataron con GDNF durante tres días (3d) antes del inicio de la mielinización debido a la adición de ácido ascórbico y se continuó durante siete días (7d) el tratamiento con este factor (Figura R8A), analizando el grado de mielinización obtenido mediante microscopía confocal (Figura R8B) y de fluorescencia (Figura R8C), comparándolo con el efecto obtenido por la presencia de GDNF únicamente durante los siete días (7d) de mielinización activa.

Los resultados obtenidos indican que el pretratamiento con GDNF en etapas previas a la formación de mielina es capaz de potenciar los efectos positivos, incrementando la efectividad de este factor respecto a los tratados con GDNF sólo durante los siete días (7d) tras la inducción con ascórbico. Así, en los cocultivos pretratados con GDNF se observó un incremento tanto en el número de figuras de recubrimiento MAG+ como en el número de figuras MBP+ indicativas de mielina madura (Figura R8B). Con objeto de corroborar este

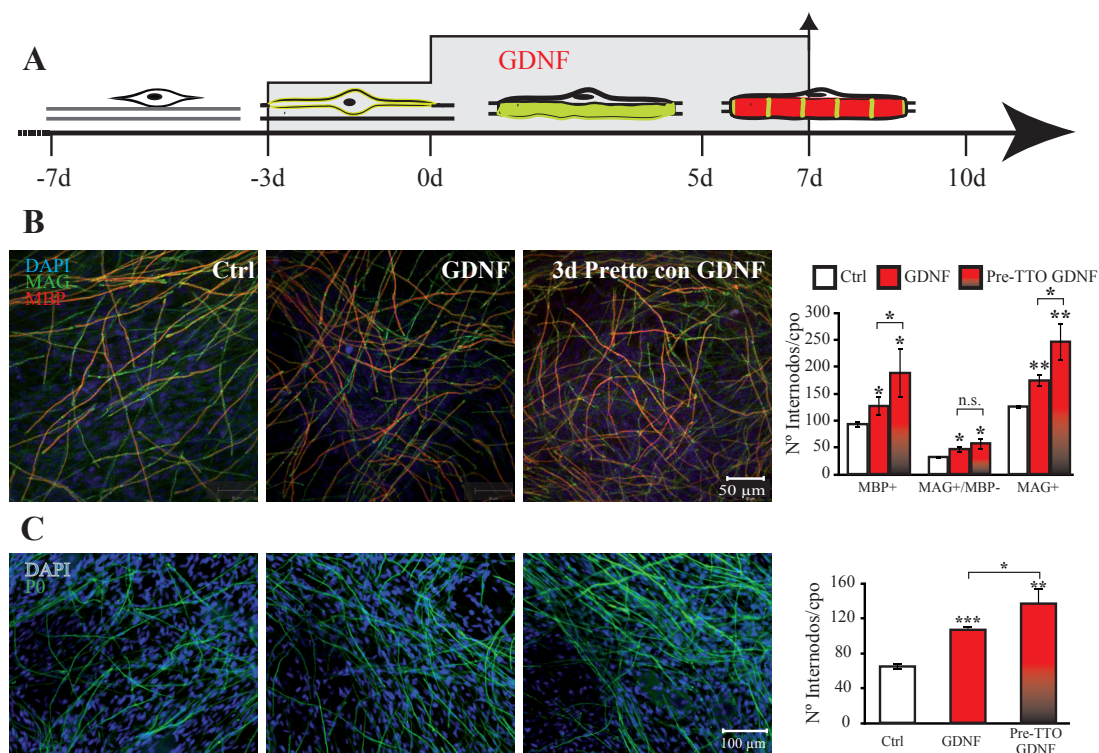




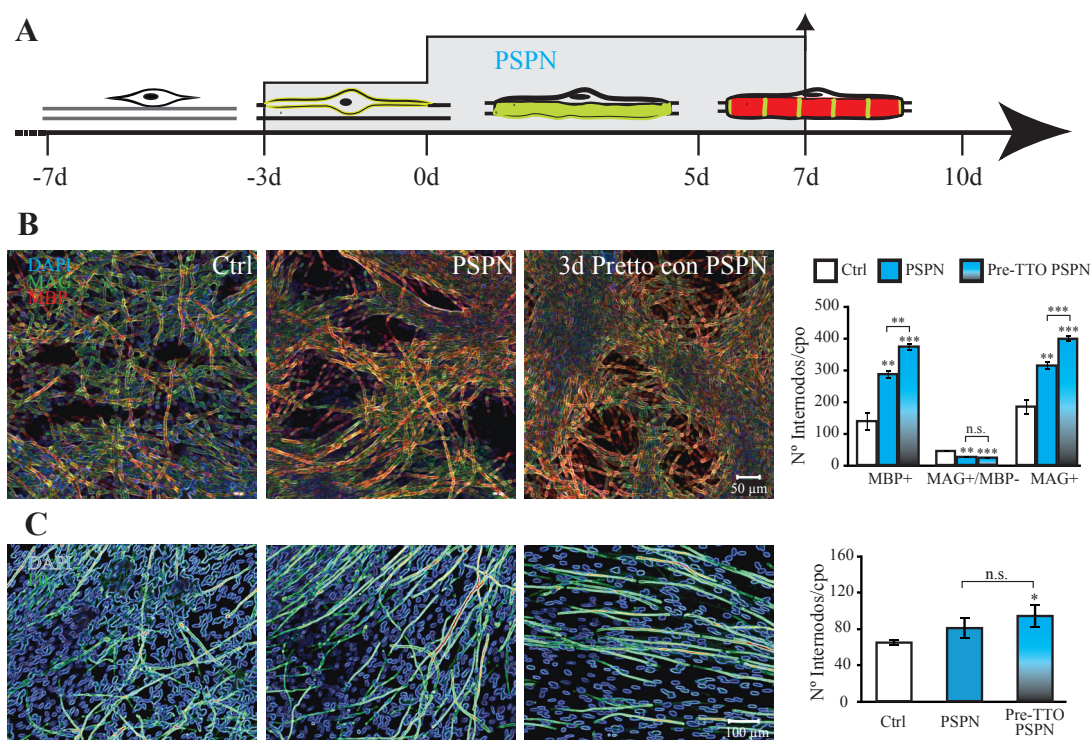
incremento en el grado de mielinización de los cultivos, se analizó la presencia de internodos maduros de mielina mediante tinción contra la principal proteína estructural de mielina P0, apreciándose de nuevo que el tratamiento con GDNF produjo un aumento en el número de imágenes P0+, incremento que fue incluso mayor en aquellos cocultivos que habían estado en presencia de dicho factor desde tres días antes del inicio de la mielinización (Figura R8C).

De forma similar, el pretratamiento con PSPN en etapas previas a la formación de

mielina también potencia sus efectos positivos, incrementando la actividad mielinogénica de este factor con respecto a los tratados con PSPN durante siete días (7d) (Figura R9). De nuevo, como se apreciaba en los estudios sobre el efecto de PSPN y GDNF durante 10 días en tratamientos concomitantes a la inducción de mielina, el fuerte incremento en el recubrimiento axonal que puede deducirse de los resultados de inmunohistoquímica contra MAG en presencia de PSPN proviene casi en su totalidad en la aparición de nuevos internodos de mielina madura MBP+.



**Figura R8. El Pretratamiento con GDNF aumenta su efecto sobre la mielinización.** (A) Esquema del curso temporal del experimento. Cocultivos mielinizantes establecidos sobre Matrigel fueron pretratados o no con GDNF (25ng/mL) durante los 3 días previos a la adición de ácido ascórbico (día 0); posteriormente se continúa o inicia el tratamiento con dicho factor por otros 7 días. (B) El grado de recubrimiento y/o maduración de los cultivos se analizó mediante microscopía confocal mediante marcaje con anticuerpos específicos contra proteínas de mielina MAG (verde) y MBP (rojo). En los paneles derechos se muestra la cuantificación del número de internodos de mielina y grado de maduración de los cultivos, diferenciándose entre figuras de mielina madura (MBP+) y figuras inmaduras en las que se sólo se aprecia recubrimiento del axón en ausencia de MBP (MAG+/MBP-), así como el grado total de recubrimiento de los axones (MAG+). (C) La formación de mielina madura se determinó mediante microscopía de fluorescencia por tinción específica con anticuerpos contra la proteína estructural de mielina P0 (verde). En los panel derecho se muestra la cuantificación del número de internodos de mielina presentes en los cultivos. En todos los casos, los núcleos se visualizaron mediante tinción con DAPI (azul) y los resultados de cuantificación se muestran como la media  $\pm$  s.d. Los asteriscos muestran las diferencias estadísticamente significativas con  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)



**Figura R9. El pretratamiento con PSPN aumenta parcialmente su efecto sobre la mielinización.** (A) Esquema del curso temporal del experimento. Cocultivos mielinizantes establecidos sobre Matrigel fueron pretratados o no con PSPN (25ng/mL) durante los 3 días previos a la adición de ácido ascórbico (día 0); posteriormente se continúa o inicia el tratamiento con dicho factor por otros 7 días. (B) El grado de recubrimiento y/o maduración de los cultivos se analizó mediante microscopía confocal mediante marcaje con anticuerpos específicos contra proteínas de mielina MAG (verde) y MBP (rojo). En los paneles derechos se muestra la cuantificación del número de internodos de mielina y grado de maduración de los cultivos, diferenciándose entre figuras de mielina madura (MBP+) y figuras inmaduras en las que sólo se aprecia recubrimiento del axón en ausencia de MBP (MAG+/MBP-), así como el grado total de recubrimiento de los axones (MAG+). (C) La formación de mielina madura se determinó mediante microscopía de fluorescencia por tinción específica con anticuerpos contra la proteína estructural de mielina P0 (verde). En los panel derecho se muestra la cuantificación del número de internodos de mielina presentes en los cultivos. En todos los casos, los núcleos se visualizaron mediante tinción con DAPI (azul) y los resultados de cuantificación se muestran como la media  $\pm$  s.d. Los asteriscos muestran las diferencias estadísticamente significativas con  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

### Los Efectos de GDNF y PSPN sobre la mielinización in vitro son independientes de sustrato

Los resultados señalados en los apartados anteriores se generaron a partir de cocultivos sembrados sobre Matrigel, una preparación compleja de membrana basal rica en proteínas de matriz extracelular (aproximadamente 60% laminina, 30% colágeno IV y 8% entactina), en la que están también presentes, aunque en una baja proporción, otros factores tróficos que podrían influir en la formación de mielina (tales como perlecan, EGF, bFGF, NGF, PDGF, IGF-1 y TGF- $\beta$ ).

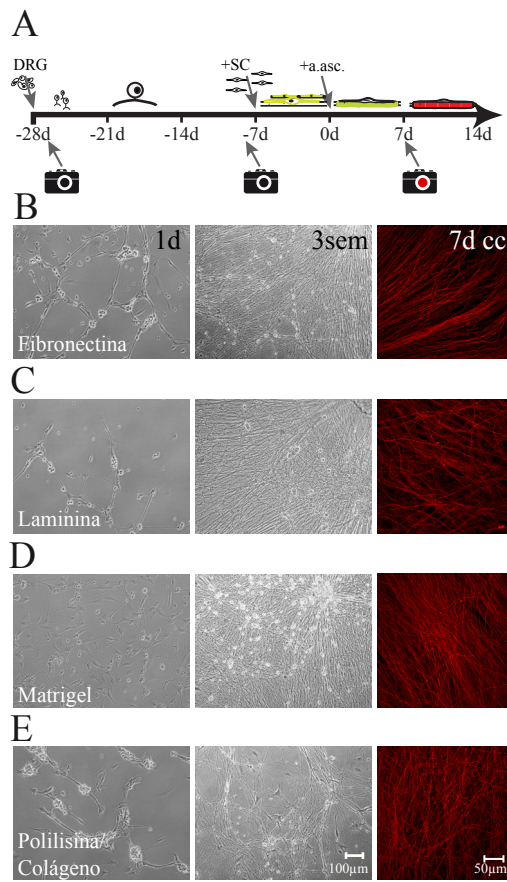
Con el objeto de evaluar si el sustrato sobre el cual se establecen los cultivos pudiera

tener alguna influencia sobre los resultados obtenidos, se realizaron cocultivos sembrados sobre otros sustratos más simples como fibronectina, laminina y colágeno (Figura R10).

Todos estos sustratos permitieron el establecimiento de cultivos neuronales y, posteriormente, cocultivos de neuronas sensoriales con células de Schwann, de una forma lo suficientemente robusta como para permitir la recapitulación del proceso de mielinización *in vitro* (Figura R11).

Tanto la red axonal obtenida durante el establecimiento del cultivo de neuronas, como la formación de mielina sobre Matrigel fue más robusta que la obtenida en cocultivos





**Figura R10. Establecimiento de cultivos de neuronas DRGs en diversos sustratos.** (A) Esquema del curso temporal del experimento. Los tiempos están referidos al momento de inducción con ácido ascórbico (día 0). Se establecieron cultivos de neuronas sensoriales en diferentes sustratos. Tres semanas más tarde, se sembraron células de Schwann para establecer los cocultivos. Tras permitir que las SCs proliferasen y cubriesen los cultivos, se inició el proceso de formación de mielina mediante la adición de ácido ascórbico. La progresión de los cultivos se observó mediante microscopía de contraste de fases (1 día o 3 semanas tras el establecimiento de los cultivos) o mediante microscopía confocal tras tinción inmunológica con anticuerpo específico contra Neurofilamento (rojo) 7 días tras la inducción del proceso de mielinización. Los sustratos analizados fueron (B) fibronectina, (C) laminina, (D) Matrigel y (E) poli-L-lisina/colágeno.

sembrados sobre el resto de sustratos, lo cual podría indicar que este sustrato influye de manera positiva sobre la formación de mielina en situación control, bien por la existencia de otros factores tróficos o meramente como consecuencia de una mejor adhesión neuronal y el establecimiento de una red axonal más compleja.

En los cocultivos tratados con fibronectina, se

observó que este sustrato no permite una buena adhesión de las neuronas a las placas de cultivo y que los axones del mismo tienden a soltarse de la placa si no se tiene excesivo cuidado al momento de manipular dichas placas de cultivo; sin embargo, con el cuidado adecuado, las neuronas acaban presentando un buen crecimiento y llegan a establecer una buena red axonal (Figura R10B). Los resultados de formación de mielina con fibronectina como sustrato en caso del control indican que este sustrato es permisivo para su formación aunque, en comparación con Matrigel, el índice de mielina obtenido es más reducido (Figura R11B).

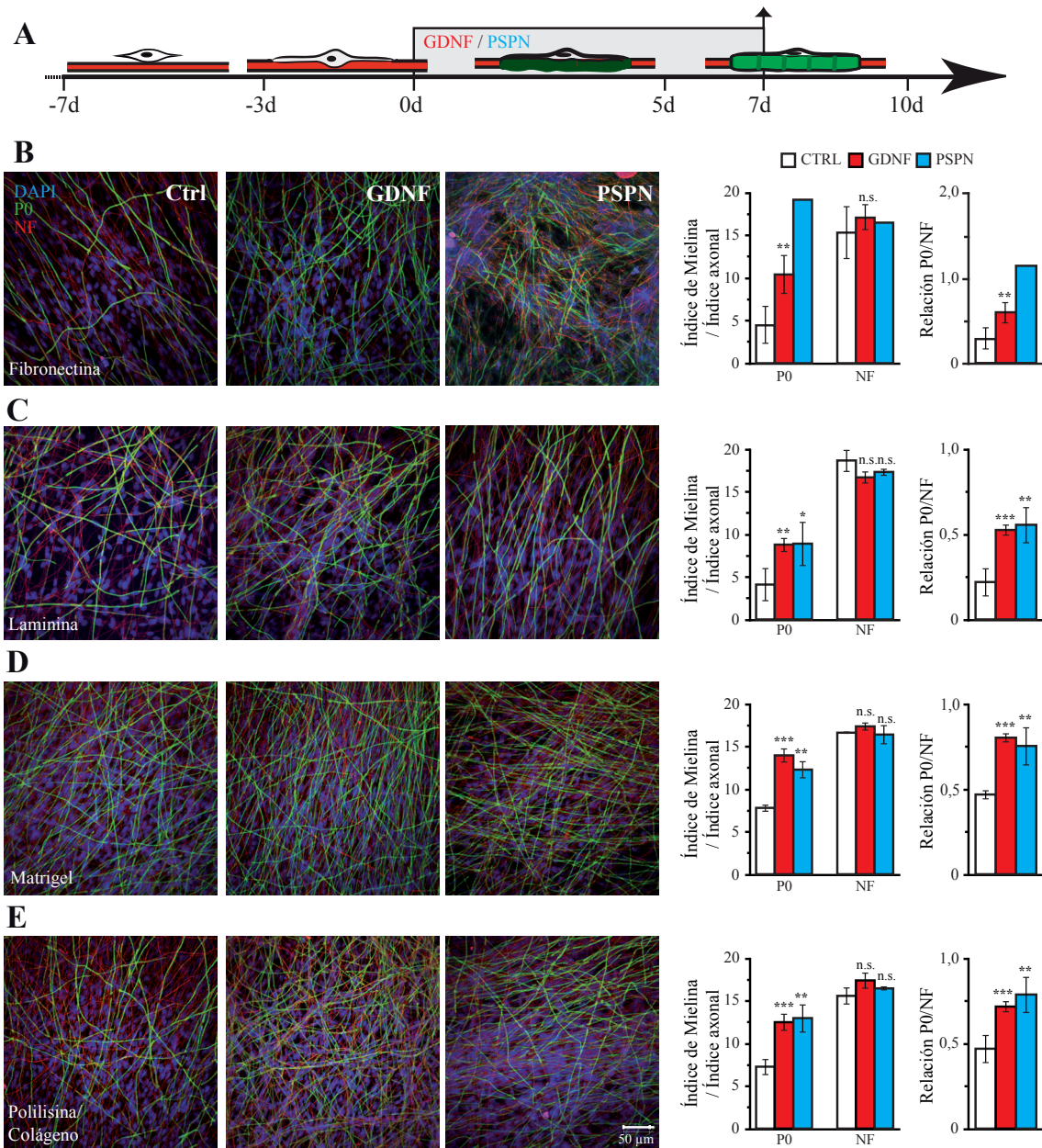
Otro sustrato utilizado y que corresponde al 60% de las proteínas presentes en Matrigel es la laminina. En este caso, tanto la capacidad de adhesión inicial, como la habilidad para dar lugar a una red axonal compleja son similares a las obtenidas en presencia de Matrigel (Figura R10C); sin embargo, al pasar de los días la adhesión celular disminuye ligeramente con respecto a Matrigel. Aunque algo mejor que lo obtenido en presencia de fibronectina, la capacidad para formar mielina en situaciones control sigue siendo algo menor que la que se puede apreciar en cultivos crecidos en Matrigel (Figura R11C).

Finalmente, también se establecieron cocultivos sobre un sustrato de colágeno, para lo cual se realiza su deposición sobre las placas de cultivo de manera posterior al pretratamiento con poli-L-lisina, lo cual permite mejorar la interacción electrostática entre los iones de carga negativa de la membrana celular y la superficie de cultivo, aumentando de este modo el número de sitios cargados positivamente disponibles para la unión celular. El colágeno, correspondiente al 30% del preparado de Matrigel es el sustrato tradicionalmente utilizado para este tipo de cultivos debido a sus propiedades para la adhesión y diferenciación neuronal; además, no contiene factores o sustancias adicionales que pudieran enmascarar el efecto de ciertos tratamientos. Este sustrato permite una buena





## RESULTADOS



adhesión a la placa de las DRGNs, aunque menor que la obtenida en presencia de Matrigel, y posibilita la formación de una compleja red axonal similar a la obtenida con este último compuesto (Figura R10E). En presencia de colágeno, la capacidad de formación de mielina

de los cultivos en condiciones control es similar a la obtenida en presencia de Matrigel (Figura R11E).

En cualquier caso, con independencia de la permisividad que mostrasen los distintos



sustratos para la formación de mielina en condiciones basales, el tratamiento con GDNF o PSPN durante siete días (7d) de manera concomitante a la inducción de la mielinización produjo un incremento en la cantidad de mielina obtenida. Estos incrementos son similares en todos los casos y, si cabe, pueden apreciarse con más claridad de forma relativa en aquellas condiciones en las que la formación de mielina basal no está tan favorecida, como es el caso de la laminina o la fibronectina.

### **Efectos de GFLs en la Formación de Mielina en Cocultivos Mantenidos en Medio Neurobasal**

Durante la realización de este proyecto de tesis doctoral, se describió que GDNF era capaz de potenciar de forma muy significativa la formación de mielina en un sistema de cocultivos mielinizantes distinto del habitualmente empleado en el laboratorio [186]. Así, en los resultados anteriores en los que analizamos la influencia de GDNF y PSPN sobre el proceso de mielinización en nuestro modelo de cocultivo, el efecto se obtuvo en cocultivos, bajo la presencia continuada de NGF (100ng/mL) tanto durante el establecimiento del cocultivo como durante el posterior tratamiento de los mismos con factores miembros de la familia de GFLs. Asimismo, nuestros cultivos se establecen y mantienen durante todo el tiempo en presencia de suero. Con objeto de analizar cómo podía influir las condiciones de cultivo en la capacidad de regulación del proceso de mielinización por GFLs, nos propusimos replicar los estudios sobre GDNF realizados por el grupo de Zhang y colaboradores, ampliando dichos estudios a PSPN.

Para estos ensayos, el establecimiento y maduración de los cocultivos se realizó en medio neurobasal suplementado con glucosa, glutamina y B27, en presencia de NGF (100ng/mL), siendo mantenidos en ausencia de suero hasta el inicio de la inducción de la formación de mielina, que se realiza mediante la adición de ácido ascórbico, y consecuente tratamiento

con los factores a estudio a una concentración de 10ng/mL en lugar de los habituales 25 ng/mL de nuestros ensayos.

### **Incremento de la formación de internodos de mielina en ausencia de NGF y suero**

Al replicar los resultados mostrados por Zhang y colaboradores, se dispuso de cocultivos en medio sin suero a los que, en el momento de la inducción con ácido ascórbico se les retiró el NGF presente desde el inicio, siendo tratados durante las dos semanas de maduración de los cocultivos con GDNF o PSPN a una concentración de 10 ng/mL en ausencia de la neurotrofina o manteniendo el NGF también a una concentración de 100 ng/mL, pero todo el tiempo en ausencia de suero (Figura R12A).

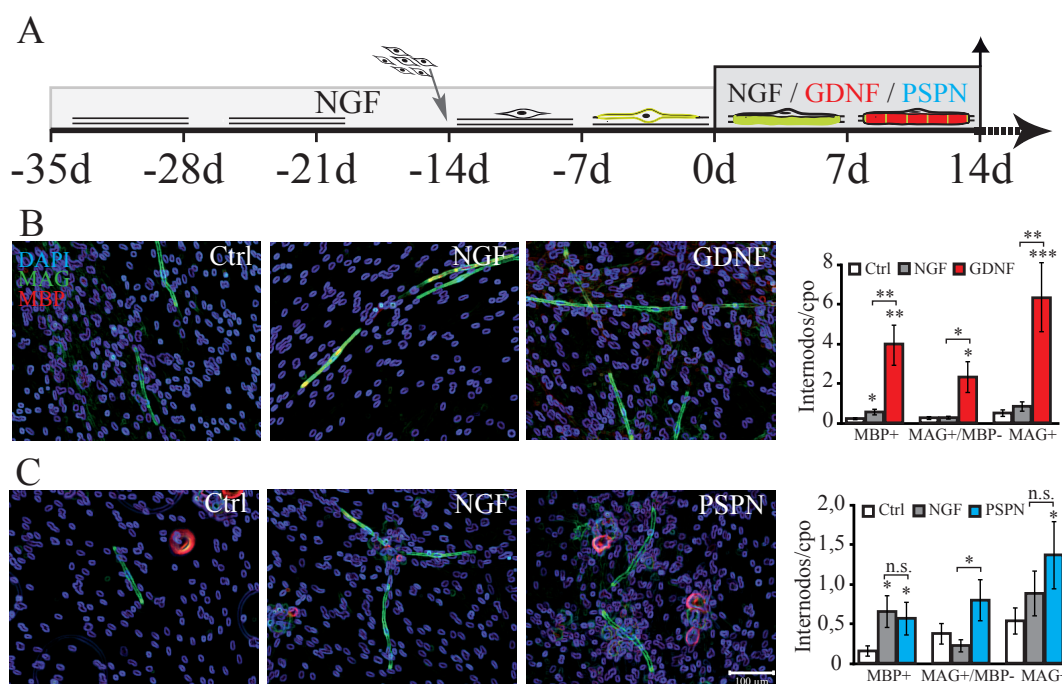
La conclusión que puede deducirse de los resultados obtenidos es que, a pesar de permitir durante un tiempo más largo la formación de mielina (quince días en lugar de los habituales siete o diez días de nuestras condiciones), la capacidad mielinogénica de los cultivos en condiciones control (ausencia de NGF) se ve gravemente comprometida comparada con la que obtenemos de forma habitual en nuestros cultivos (Figura R12B-C). Tan sólo pueden apreciarse unas pocas figuras de recubrimiento MAG+ o de mielina madura MBP+ en zonas aisladas del cocultivo, mientras que la mayor parte de los campos observados no presentan ni una sola figura de mielina o de recubrimiento axonal.

La adición de NGF 100 ng/mL concomitantemente al tratamiento con ácido ascórbico produce un ligero aumento en las figuras de mielina que pueden ser observadas pero, de nuevo, en una muy baja proporción comparado con lo obtenido en nuestras condiciones habituales de cultivo en presencia de suero.

El tratamiento con PSPN durante las dos semanas de inducción también fue capaz de producir un aumento significativo tanto en el recubrimiento como en la formación de mielina madura con una eficacia similar a la obtenida







**Figura R12. Efectos positivos de GDNF y PSPN sobre la formación de mielina en ausencia de NGF.** (A) Esquema del curso temporal de los experimentos. Se establecieron cocultivos mielinizantes en medio NB en ausencia de suero suplementado con B27 y en presencia de NGF (100 ng/mL) sobre poli-L-lisina/colágeno durante los tiempos indicados. Dos semanas tras la adición de SCs se indujo la formación de mielina con ácido ascórbico, al mismo tiempo que se retiró el NGF del medio. Los cultivos fueron mantenidos en medio NB suplementado con B27 en ausencia de suero durante 16 días adicionales, bien en ausencia de ningún factor neurotrófico (CTRL), retratados con NGF (100 ng/mL) o tratados con (B) GDNF o (C) PSPN (10 ng/mL). Se analizó la formación de mielina por microscopía de fluorescencia, con marcaje de anticuerpos específicos contra proteínas de mielina MAG (verde) y MBP (rojo), los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). En los paneles superiores se muestran microfotografías de zonas en las que se aprecia la aparición de figuras de mielina. Los paneles inferiores muestran la cuantificación del número de internodos de mielina y grado de maduración de los cultivos, diferenciándose entre figuras de mielina madura (MBP+) y figuras inmaduras en las que sólo se aprecia recubrimiento del axón en ausencia de MBP (MAG+/MBP-), así como el grado total de recubrimiento de los axones (MAG+). Cada punto representa la media  $\pm$  SE. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*); n.s.: no significativo.

con NGF (Figura 12C). Por otro lado, GDNF produjo un pronunciado aumento significativo en el número de figuras de recubrimiento, así como en el de internodos maduros, mostrando una eficacia muy superior a la observada con PSPN o NGF (Figura 12B).

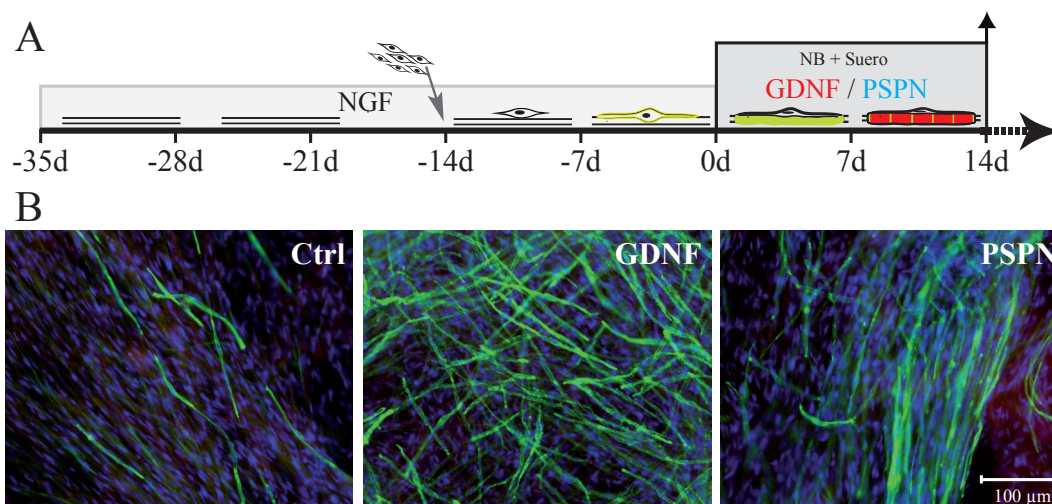
### Efecto del suero sobre la formación de mielina en ausencia de NGF

Seguidamente, y continuando con el intento de reproducir las condiciones de cultivo de Zhang y colaboradores, se analizó el efecto que GDNF y PSPN tenían sobre la formación de mielina en ausencia de NGF, aunque con la adición de suero desde el punto de inducción por ascórbico (Figura R13A). Puede deducirse de los resultados obtenidos es que, a pesar de permitir durante un tiempo más

largo la formación de mielina (quince días en lugar de los habituales siete o diez días de nuestras condiciones) y la adición de suero tras la inducción con ascórbico, la capacidad mielinogénica de los cultivos sigue estando gravemente comprometida comparada con la que obtenemos en nuestros cultivos habituales. De hecho, no se observó ni una figura MBP+ de mielina compacta, aunque sí que se apreció un grado aceptable de recubrimiento con la aparición de múltiples figuras MAG+ (Figura R13B).

En cualquier caso, la adición de GDNF o, en mucha menor medida, de PSPN produjo un notable incremento en el número de figuras de recubrimiento MAG+ obtenidas en los cultivos. De todas formas, y al contrario de lo descrito por Zhang y colaboradores, ni aún en





**Figura R13. Efectos positivos de GDNF y PSPN sobre la formación de mielina en ausencia de NGF.** (A) Esquema del curso temporal de los experimentos. Se establecieron cocultivos mielinizantes en medio NB en ausencia de suero suplementado con B27 y en presencia de NGF (100 ng/mL) sobre poli-L-lisina/colágeno durante los tiempos indicados. Dos semanas tras la adición de SCs se indujo la formación de mielina con ácido ascórbico, al mismo tiempo que se retiró el NGF del medio. A partir de este momento, los cultivos fueron mantenidos en medio NB suplementado con B27 en presencia de suero durante 16 días adicionales, bien en ausencia de ningún factor neurotrófico (Ctrl), o tratados con GDNF o PSPN (10 ng/mL). (B) Se analizó la formación de mielina por microscopía de fluorescencia, con marcaje de anticuerpos específicos contra proteínas de mielina MAG (verde) y MBP (rojo), los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). En ninguna de las condiciones analizadas se pudo apreciar la aparición de figuras de mielina madura caracterizadas por la presencia de inmunoreactividad contra MBP.

presencia de GDNF se aprecia la aparición de figuras de mielina madura MBP+.

Estos resultados indican que, incluso en condiciones en las que la formación de mielina no se ve favorecida, como es la ausencia de NGF y/o suero, tanto GDNF como PSPN son capaces de incrementar la capacidad mielinogénica de los cultivos.

### **Rutas de Transición de Señales Implicadas en la Modulación de la Mielinización por GFLs**

Habiendo determinado que los distintos GFLs son capaces de modular positivamente la formación de mielina en el sistema nervioso periférico, nos propusimos analizar la contribución de las distintas rutas de señalización activadas por estos factores en los efectos observados.

Para ello, se estudió el efecto de inhibidores específicos de las principales rutas de señalización descritas para los GFLs sobre la inducción de la formación de mielina mediada por GDNF y PSPN.

### **Participación del receptor Ret en la señalización por GDNF y PSPN**

La ruta de transición de señales canónica para todos los GFLs pasa por la activación de Ret, un receptor tirosina quinasa típico que puede ser activado por todos los GFLs a través de su unión a los distintos co-receptores de la familia GFR $\alpha$ .

Con objeto de analizar su contribución al fenómeno analizado, cocultivos mielinizantes fueron tratados previamente a la inducción de la formación de internodos de mielina con un inhibidor específico de Ret (Ret-INH), para añadir seguidamente PSPN o GDNF, todo ello dos días antes de la inducción con ácido ascórbico, manteniendo posteriormente tanto el inhibidor como el tratamiento con PSPN o GDNF durante 7 días más (Figura R14A).

El tratamiento con dicho inhibidor no tuvo ningún efecto sobre la formación basal de mielina, lo que indica que la funcionalidad de Ret es dispensable para el proceso de mielinización (Figura R14B) y no afecta, ni al número de figuras de recubrimiento MAG+



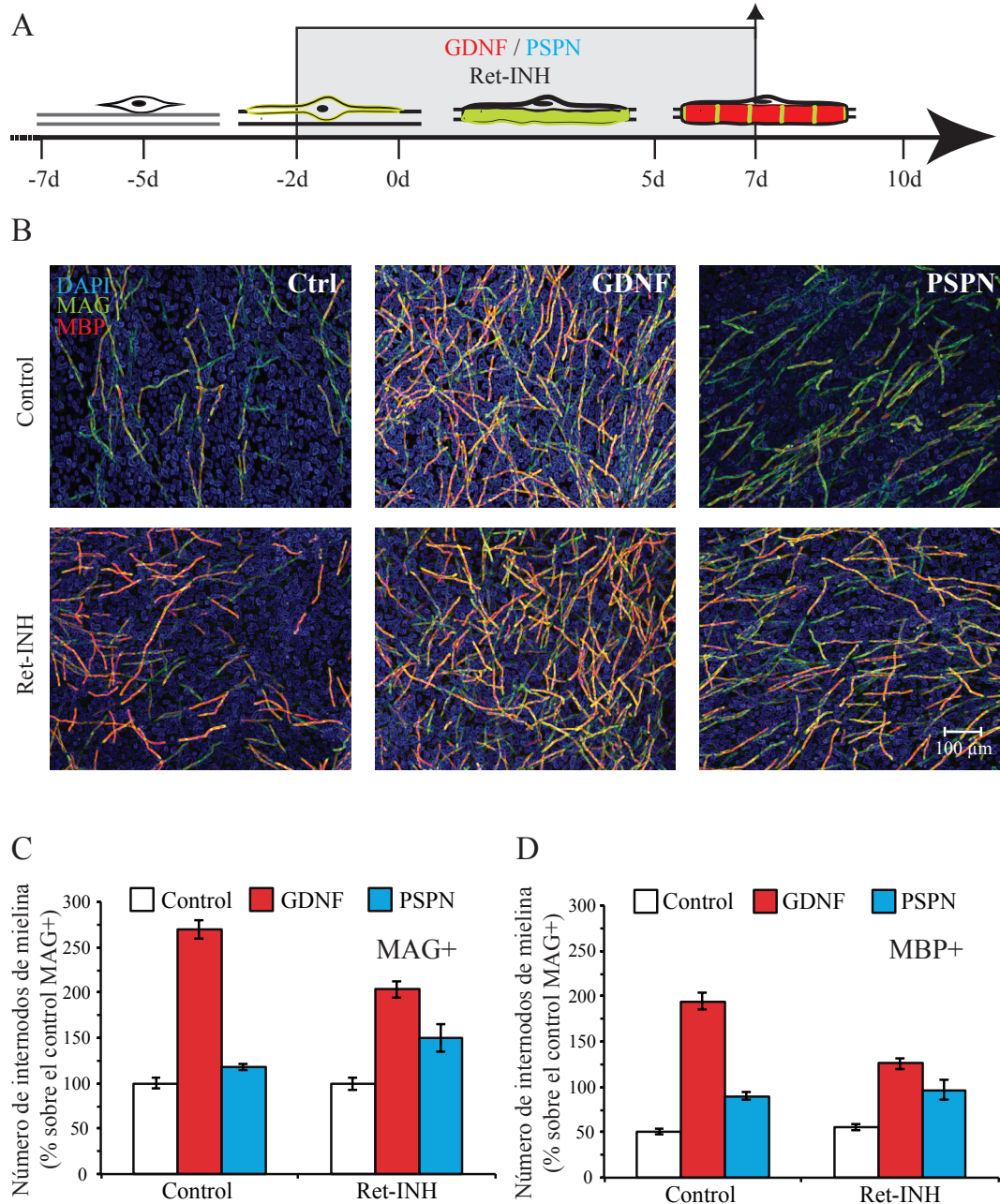
## RESULTADOS

obtenido (Figura R14C), ni al de imágenes de mielina madura MBP+ (Figura R14D).

Ret-INH fue capaz de producir una disminución parcial del efecto del GDNF, tanto sobre el aumento en el índice de recubrimiento como sobre el número de internodos maduros

obtenidos. Curiosamente, este efecto es selectivo para GDNF, porque la presencia de Ret-INH no fue capaz de alterar los efectos positivos de PSPN

Estos resultados indican que el efecto positivo de GDNF sobre el proceso de mielinización



**Figura R14. Participación de Ret en la señalización por GDNF y PSPN.** (A) Esquema del curso temporal del experimento. Cocultivos mielinizantes establecidos sobre Matrigel fueron pretratados con GDNF o PSPN (25ng/mL) en presencia o ausencia de un inhibidor de la señalización por Ret (Ret-INH) durante los 2 días previos a la adición de ácido ascórbico (día 0); manteniendo los tratamiento por otros 7 días. (B) El grado de recubrimiento y/o maduración de los cultivos se analizó mediante microscopía confocal mediante marcaje con anticuerpos específicos contra proteínas de mielina MAG (verde) y MBP (rojo); los núcleos se visualizaron mediante tinción con DAPI (azul). (C-D) Cuantificación del efecto de la inhibición de Ret sobre el grado de recubrimiento de los axones (C; figuras MAG+) o la aparición de figuras de mielina madura (D; figuras de MBP+). Los resultados de cuantificación se muestran como la media  $\pm$  SEM relativizados al número de figuras MAG+ obtenidas en condiciones control.





periférica es sólo parcialmente dependiente de la señalización canónica vía Ret, mientras que la mayor parte de la efectividad de este factor, y la totalidad del efecto de PSPN es independiente de Ret.

### **Participación del receptor NCAM en la señalización por GDNF y PSPN**

Además de la ruta de señalización canónica del receptor tirosina quinasa Ret, se ha descrito que los GFLs pueden actuar a través de NCAM; que, aparte de su función como molécula de adhesión celular, es capaz de inducir la activación de distintas rutas de señalización intracelular. Así, en respuesta a la unión a GFLs, se ha visto que NCAM puede señalar mediante rutas intracelulares dependientes de la activación del receptor de FGF (FGFR), de la activación de Fyn, o de la activación de CamKII. Por ello, nos propusimos analizar la posible contribución relativa de estas tres vías de señalización sobre los efectos mielinogénicos de GDNF y PSPN.

#### Participación de NCAM en la señalización por GFLs: Implicación de FGFR

Para analizar la contribución de FGFR sobre los efectos de GDNF y PSPN en la mielinización periférica empleamos un paradigma similar al indicado en el caso de Ret, pero utilizando SU-5405 como inhibidor específico de FGFR (Figura R15A). Este compuesto es capaz de bloquear la acción de FGFR, aunque también es capaz de impedir con alta afinidad la acción del receptor de VEGF (VEGFR).

En este caso, la mera presencia de SU-5405, ya produce una cierta inhibición basal del proceso de mielinización (Figura R15B), disminuyendo tanto el número de figuras de recubrimiento MAG+ obtenidas (Figura R15C) como el de imágenes de mielina madura MBP+ (Figura R15D).

Sorprendentemente, la inhibición de la actividad de FGFR no sólo fue incapaz de disminuir el efecto pro-mielinogénico de GDNF o PSPN sino que, incluso, estos

factores fueron más efectivos en presencia del inhibidor. Esto es especialmente aparente en el caso del GDNF en el que, en presencia del inhibidor, tanto el recubrimiento axonal como, sobre todo, la cantidad de mielina madura obtenida fue mucho mayor que en ausencia del inhibidor. Por otro lado, PSPN presentó una potencia relativa mayor en presencia del inhibidor ya que, partiendo de niveles basales más bajos, alcanzó un grado de mielinización absoluta similar o incluso ligeramente mayor a la observada en ausencia de SU-5405.

Estos resultados nos permiten concluir, por un lado, que la actividad de FGFR, o posiblemente VEGFR, tiene un efecto positivo sobre la formación de mielina basal mientras que la activación de FGFR por GFLs participa en una ruta anti-mielinogénica activada por estos factores.

#### Participación de NCAM en la señalización por GFLs: Implicación de CaMKII

Para analizar la contribución de CamKII sobre los efectos de GDNF y PSPN en la mielinización periférica empleamos un paradigma similar al indicado en los casos anteriores, pero utilizando Kn62 como inhibidor específico de CamKII (Figura R16A).

Respecto a la mielinización basal en ausencia de GFLs exógenos, la inhibición de CaMKII produce una fortísima disminución en la capacidad mielinogénica de los cultivos (Figura R16B). Este efecto es destacable en el número de figuras de recubrimiento MAG+ observado en los cultivos (Figura R16C) y es especialmente dramático en la reducción del número de internodos maduros MBP+ (Figura R16D) en el que, en presencia de dicho inhibidor, prácticamente no se aprecian internodos de mielina madura.

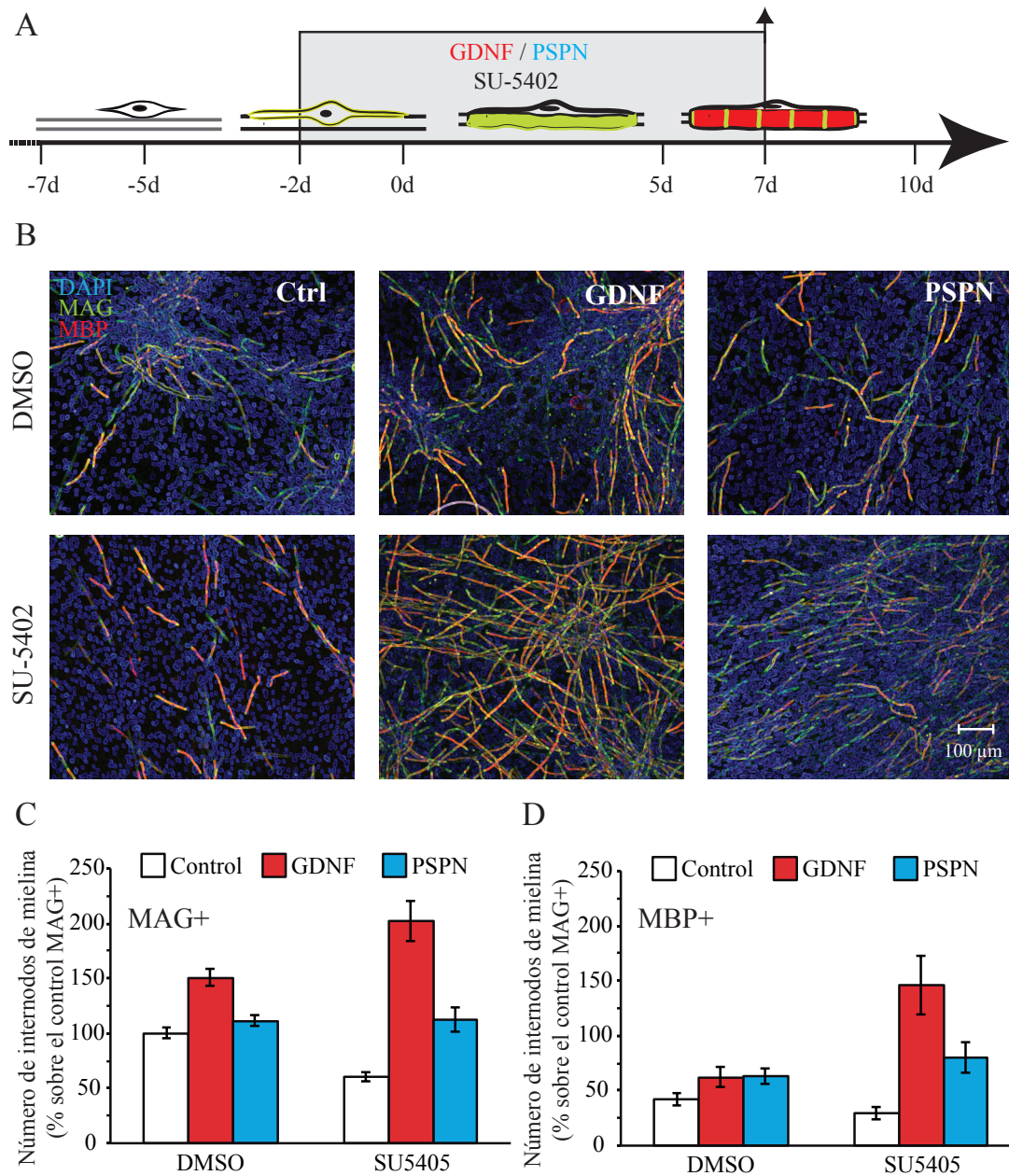
Sobre esta dramática inhibición del proceso de mielinización, el tratamiento con GDNF, aunque no PSPN, es capaz de producir un cierto aumento relativo tanto en el número de figuras de recubrimiento como en el de internodos maduros.



## RESULTADOS

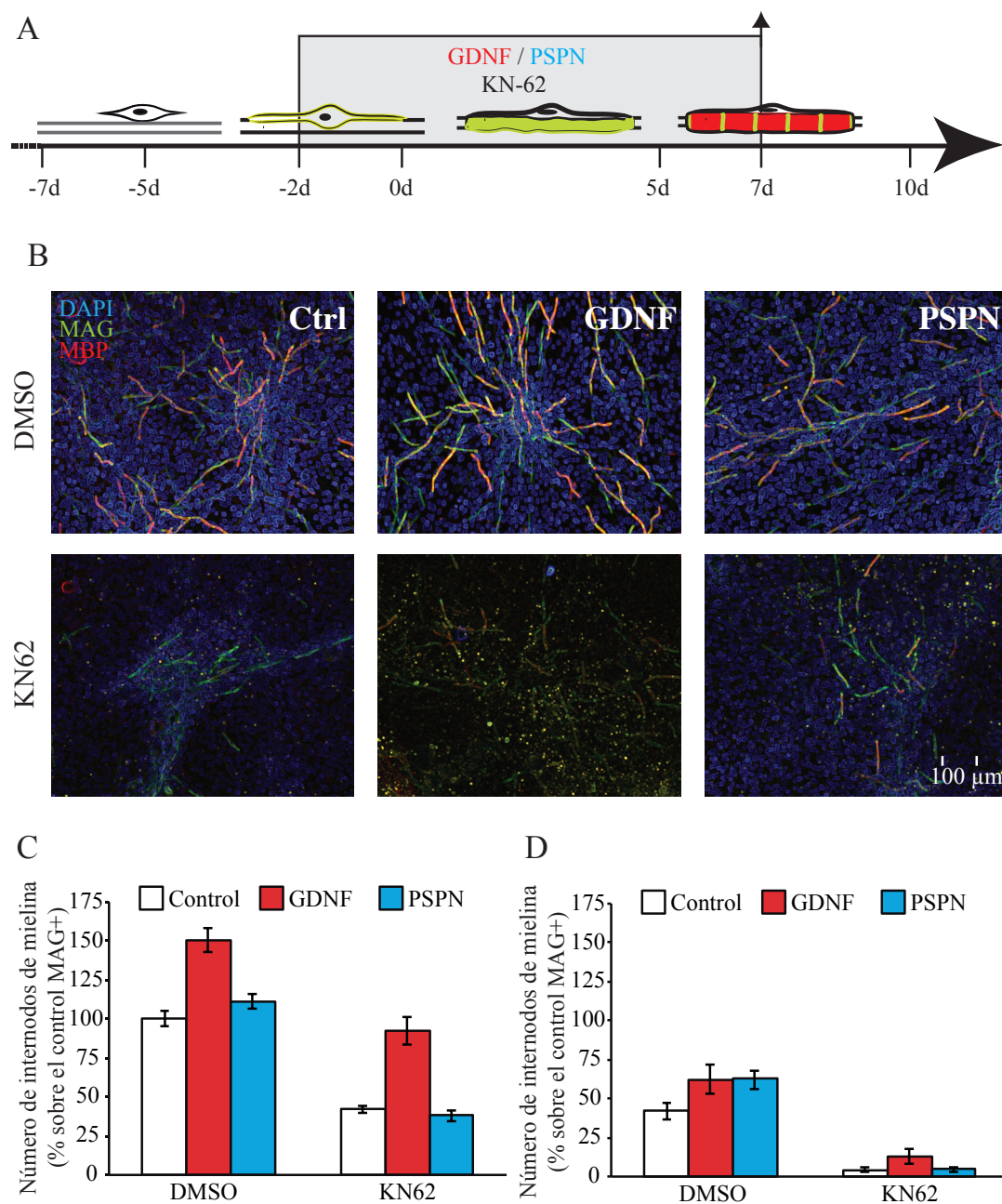
Estos resultados indican que la actividad de CaMKII es imprescindible para el correcto devenir del proceso de mielinización periférica,

aunque parcialmente dispensable para los efectos positivos de GDNF.



**Figura R15. Participación de NCAM en la señalización por GDNF y PSPN: Implicación de FGFR.** (A) Esquema del curso temporal del experimento. Cocultivos mielinizantes establecidos sobre Matrigel fueron pretratados con GDNF o PSPN (25ng/mL) en presencia o ausencia de un inhibidor de la señalización por FGFR (SU-5402) durante los 2 días previos a la adición de ácido ascórbico (día 0); manteniendo los tratamientos por otros 7 días. (B) El grado de recubrimiento y/o maduración de los cultivos se analizó mediante microscopía confocal mediante marcaje con anticuerpos específicos contra proteínas de mielina MAG (verde) y MBP (rojo); los núcleos se visualizaron mediante tinción con DAPI (azul). (C-D) Cuantificación del efecto de la inhibición de FGFR sobre el grado de recubrimiento de los axones (C; figuras MAG+) o la aparición de figuras de mielina madura (D; figuras MBP+). Los resultados de cuantificación se muestran como la media  $\pm$  SEM relativizados al número de figuras MAG+ obtenidas en condiciones control.





**Figura R16. Participación de NCAM en la señalización por GDNF y PSPN: Implicación de CaMKII.** (A) Esquema del curso temporal del experimento. Cocultivos mielinizantes establecidos sobre Matrigel fueron pretratados con GDNF o PSPN (25ng/mL) en presencia o ausencia de un inhibidor de la señalización por CaMKII (KN62) durante los 2 días previos a la adición de ácido ascórbico (día 0); manteniendo los tratamiento por otros 7 días. (B) El grado de recubrimiento y/o maduración de los cultivos se analizó mediante microscopía confocal mediante marcaje con anticuerpos específicos contra proteínas de mielina MAG (verde) y MBP (rojo); los núcleos se visualizaron mediante tinción con DAPI (azul). (C-D) Cuantificación del efecto de la inhibición de CaMKII sobre el grado de recubrimiento de los axones (C; figuras MAG+) o la aparición de figuras de mielina madura (D; figuras MBP+). Los resultados de cuantificación se muestran como la media  $\pm$  SEM relativizados al número de figuras MAG+ obtenidas en condiciones control.





## RESULTADOS

### Participación de NCAM en la señalización por GFLs: Implicación de Fyn

Fyn es uno de los miembros de la familia SLK, por lo que para analizar su posible contribución sobre los efectos de GDNF y PSPN en la

mielinización periférica empleamos un paradigma similar a los anteriores, pero utilizando PP2, un compuesto capaz de inhibir la acción de los diferentes SLKs (Figura R17A).

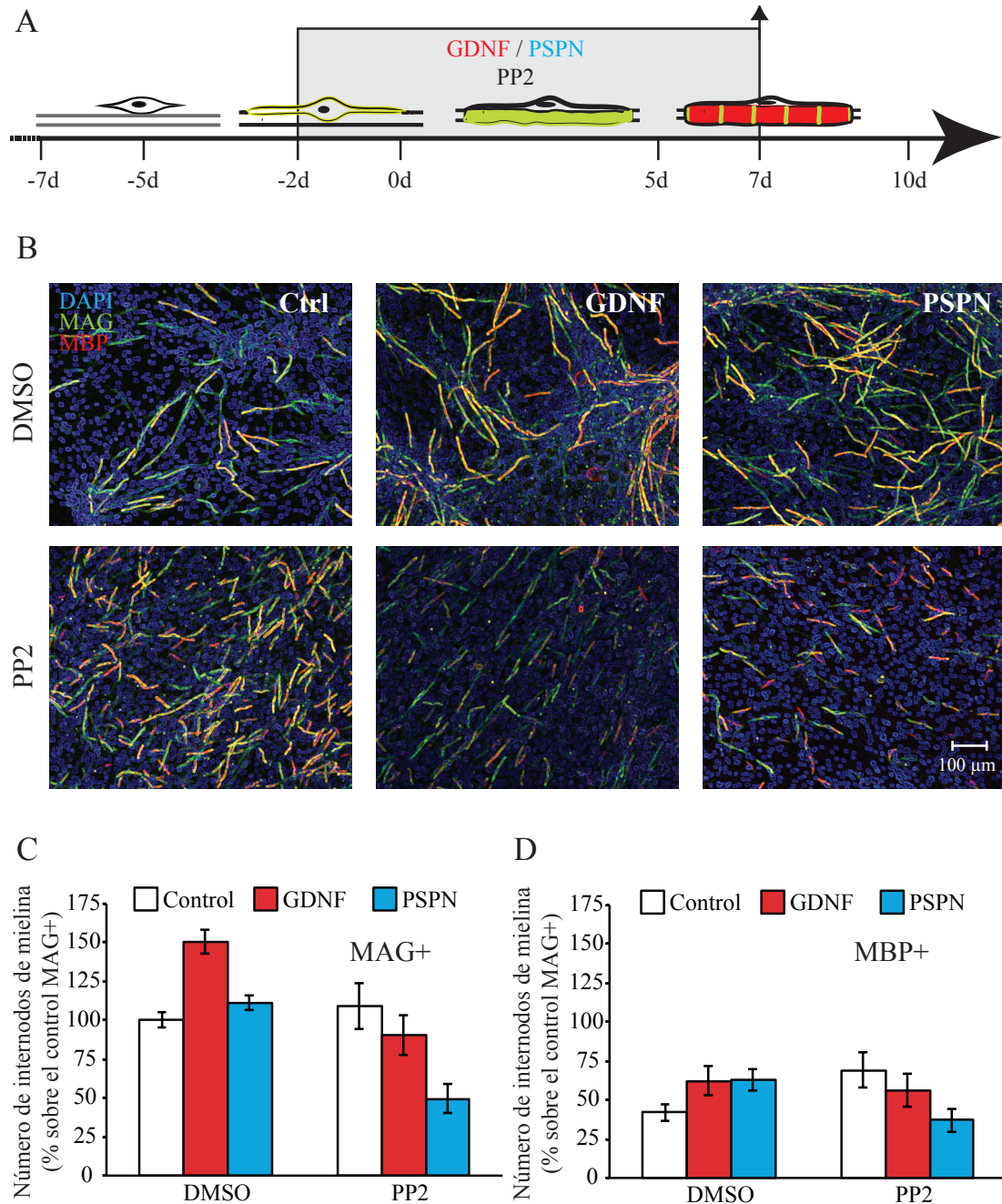


Figura R17. Participación de NCAM en la señalización por GDNF y PSPN: Implicación de Fyn. (A) Esquema del curso temporal del experimento. Cocultivos mielinizantes establecidos sobre Matrigel fueron pretratados con GDNF o PSPN (25ng/mL) en presencia o ausencia de un inhibidor de la señalización por SLKs (PP2) durante los 2 días previos a la adición de ácido ascórbico (día 0); manteniendo los tratamientos por otros 7 días. (B) El grado de recubrimiento y/o maduración de los cultivos se analizó mediante microscopía confocal mediante marcaje con anticuerpos específicos contra proteínas de mielina MAG (verde) y MBP (rojo); los núcleos se visualizaron mediante tinción con DAPI (azul). (C-D) Cuantificación del efecto de la inhibición de Fyn sobre el grado de recubrimiento de los axones (C; figuras MAG+) o la aparición de figuras de mielina madura (D; figuras MBP+). Los resultados de cuantificación se muestran como la media  $\pm$  SEM relativizados al número de figuras MAG+ obtenidas en condiciones control.



En esta serie de estudios, lo primero que destaca es que, en presencia de PP2, la morfología de los internodos obtenida cambia de forma dramática, apreciándose una notable reducción en la longitud de los internodos obtenidos (Figura R17B). Sorprendentemente, este efecto sobre el tamaño de los internodos no se ve acompañado de una disminución aparente ni en el número de figuras de recubrimiento MAG+ observados en condiciones control (Figura R17C) ni, sobre todo, en el número de internodos maduros MBP+ que, de hecho, incluso aumenta, todo ello en ausencia de GFLs añadidos de forma exógena (Figura R17D).

Por otro lado, la inhibición de la actividad de Fyn, y del resto de las SLKs, produjo un sorprendente efecto sobre la regulación de la mielinización por GFLs. En presencia del inhibidor, no sólo se abolió el efecto promielinogénico de ambos GFLs sino que, incluso, tanto GDNF y sobre todo, PSPN pasaron a tener un efecto netamente inhibidor sobre la formación de mielina.

Estos resultados indican que las SLKs participan en el proceso de formación de mielina regulando tanto la longitud de los internodos formados, como el grado de madurez obtenido. Por otro lado, la actuación de estas quinasas y, probablemente de forma muy especial la actividad de Fyn, son necesarias para los efectos potenciados de la mielinización de GDNF y PSPN.

## **Regulación de la Migración de Células de Schwann por GFLs**

La mielinización en el SNP ha de entenderse como un proceso continuo durante el desarrollo que se inicia con la diferenciación, proliferación y migración de las SCs y que concluye con el proceso de formación de la envuelta de mielina como tal. Debido a que algunos de los receptores de GFLs se expresan en SCs aisladas, junto con el hecho de que gran parte de los factores que regulan el proceso de mielinización también son capaces de

participar en otros aspectos de la fisiopatología de las SCs,

### **NRTN y ARTN no modulan la migración de las células de Schwann**

Con objeto de analizar el posible efecto sobre la migración de las SCs, se realizó ensayos de cierre de herida a partir de cultivos establecidos sobre Poli-L-Lisina como sustrato.

El tratamiento con ARTN o NRTN durante el proceso de cierre de herida en células mantenidas en medio definido no fue capaz de modificar la velocidad de migración de las SCs (Figura R18A).

Igualmente, ninguno de estos dos factores fue capaz de alterar la velocidad de migración de las SCs en ensayos de cierre de herida en el que se añadió 10% de suero a los cultivos, como un inductor de la motilidad celular (Figura R19B).

### **GDNF y PSPN modulan la migración de las células de Schwann**

En ensayos similares utilizando GDNF o PSPN pudo apreciarse que estos otros dos factores sí son capaces de modular la migración de las SCs.

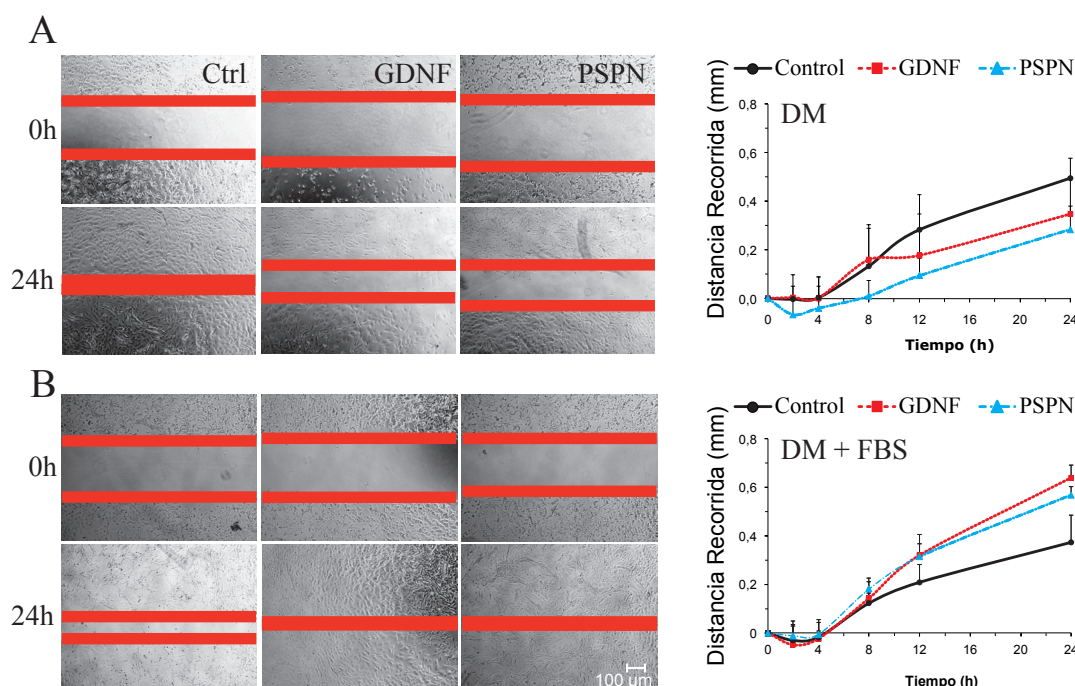
Sorprendentemente, el efecto obtenido fue distinto dependiendo si el estudio se realizó en medio definido simple o en combinación con la adición de 10% de suero al cultivo.

Tanto GDNF como PSPN produjeron una disminución en la capacidad migratoria de las SCs en ensayos de cierre de herida realizados en medio definido (Figura R19A), mientras que, por el contrario, la presencia de estos factores produjo un aumento en la capacidad migratoria de las SCs en ensayos realizados en combinación con la adición de 10% de suero al cultivo (Figura R19B).

Estos resultados en su conjunto nos indican que GDNF y PSPN son capaces de modular la migración de las SCs, negativa o positivamente dependiendo de la ausencia o presencia de suero en los ensayos. Pero no así NTRN o ARTN.







**Figura R19. GDNF y PSPN modulan la migración de SCs en presencia y ausencia de suero.** Cultivos de SCs fueron establecidos sobre poli-L-lisina. Tras realizar una herida en la monocapa, se analizó su capacidad de migración durante 24 horas en presencia o ausencia de GDNF o PSPN (25ng/mL) en (A) ausencia o (B) presencia de suero. En los paneles derechos se muestra la cuantificación de la distancia de migración a lo largo del tiempo en cada una de las condiciones, representándose como la media  $\pm$  SD para cada punto analizado.

### Los GFLs no influyen la proliferación de las SCs

En los ensayos de cierre de herida anteriormente descritos pueden solaparse dos procesos que acaben dando lugar al mismo resultado. Una herida puede cerrarse con mayor o menor rapidez no sólo porque la capacidad de migración, en este caso de las SCs, sea mayor o menor, sino también porque dichas células presenten una tasa de proliferación mayor o menor.

Aunque en las condiciones del ensayo, especialmente los realizados en presencia de medio definido sin suero, el índice de proliferación de las SCs es bastante bajo y no era de esperar que se pudiesen producir grandes diferencias en los tiempos cortos del estudio, se hizo el análisis para determinar si alguno de los distintos GFLs eran capaces de modular la proliferación de las SCs.

Para ello, se realizaron ensayos de incorporación de cristal violeta sobre cultivos de SCs purificadas tratadas con los diferentes GFLs, tanto en condiciones basales, como

en presencia de una combinación de extracto pituitario bovino (BPE) y forskolina, como un conocido inductor de la proliferación de células de Schwann.

En cultivos establecidos sobre poli-L-lisina, ninguno de los diferentes GFLs fue capaz de alterar el número de células presentes en los cultivos 48 o 72 horas después del inicio de los tratamientos (Figura R20A-B). Sin embargo, el tratamiento con BPE y forskolina sí que produjo un incremento significativo en el número de células, especialmente obvio en los tiempos largos de tratamiento. De nuevo, ninguno de los GFLs fue capaz de modular este aumento en la proliferación celular debido al tratamiento con el cóctel mitogénico.

Resultados similares fueron obtenidos cuando los ensayos de proliferación se llevaron a cabo con cultivos establecidos sobre Matrigel como sustrato (Figura R20C), en el que 72 horas de tratamiento con los distintos GFLs no fueron capaces de modular el número de SCs en ausencia de BPE y forskolina, ni de modificar la capacidad mitogénica de dicho cóctel.



Estos resultados indican que los GFLs no modifican el índice de proliferación de las células de Schwann y, por tanto, las diferencias obtenidas en los ensayos de migración se deben a la modulación de su capacidad migratoria.

## **Efectos de los Inhibidores de Señalización de NCAM en la migración de SCs**

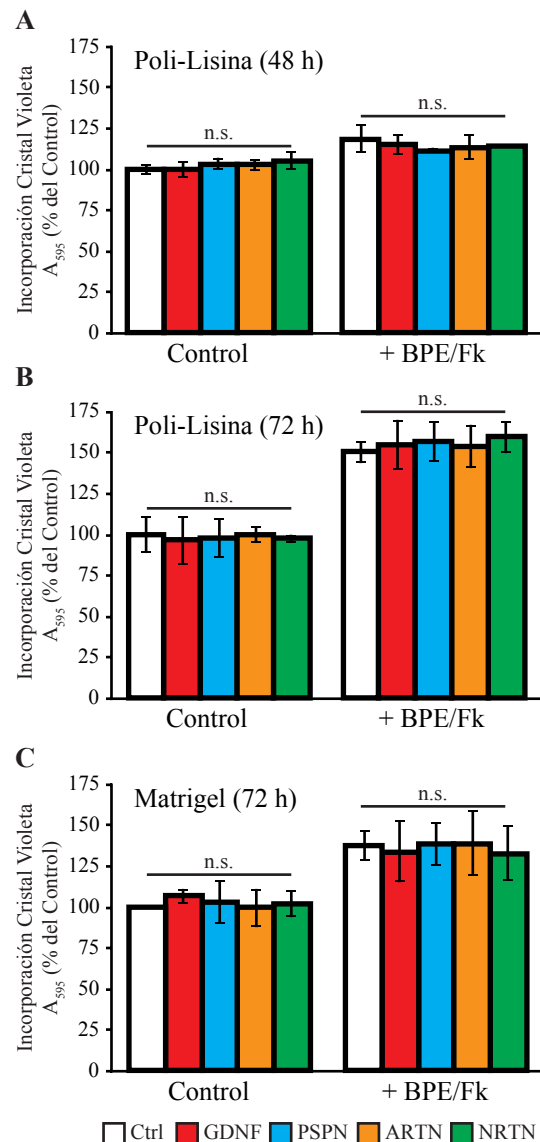
Finalmente, se pretendió analizar qué posibles rutas de transducción de señales participan en los efectos de GDNF y PSPN sobre la migración de las SCs.

Debido a que los cultivos aislados de SCs no presentan expresión detectable de Ret, nos centramos en las rutas dependientes de la señalización por NCAM, analizando en este caso únicamente el efecto inductor de la migración de dichos factores en presencia de suero.

Para ello, los cultivos fueron pretratados con los distintos inhibidores de las rutas de señalización 1 hora antes del inicio del experimento, manteniéndose posteriormente a la realización de la herida, momento en el cual se añaden al medio los distintos factores. Con el fin de confirmar que los efectos obtenidos no provenían de cambios en la proliferación de las células, se utilizó Afidicolina durante el ensayo y 48 horas antes de su inicio (cuando se condicionan las SCs al medio definido donde se realizará el ensayo), monitorizando continuamente el cierre de la herida mediante video-microscopía de time-lapse (Figura R21).

Tanto la inhibición de CaMKII por la adición de KN62 (Figura R21D) como la inhibición de Fyn y el resto de SLKs mediante el tratamiento con PP2 (Figura R21C), produjo una pequeña inhibición en la velocidad de cierre de herida en condiciones basales en ausencia de GFLs.

Sorprendentemente, el tratamiento con SU5402, el inhibidor de FGFR, prácticamente abolió la capacidad migratoria basal de las células de Schwann (Figura R21B). En este



**Figura R20. Los GFLs no inducen la proliferación de SCs.** (A,B) Cultivos de SCs purificadas fueron establecidos sobre poli-L-lisina y tratados con los distintos GFLs (25ng/mL) durante 48 (A) ó 72 horas (B). (C) Cultivos de SCs purificadas fueron establecidos sobre Matrigel y tratados con los distintos GFLs (25ng/mL) durante 72 horas. La proliferación de las células de SCs se determinó mediante la incorporación de cristal de violeta, en presencia o ausencia de 50  $\mu$ g/ml de extracto pituitario bovino y 2 $\mu$ M de forskolina (BPE/FK). Los datos mostrados son la media  $\pm$  SD de la cantidad de cristal violeta incorporado referido en todos los casos al control en ausencia de BPE/FK. Las siglas n.s indican no significativo.

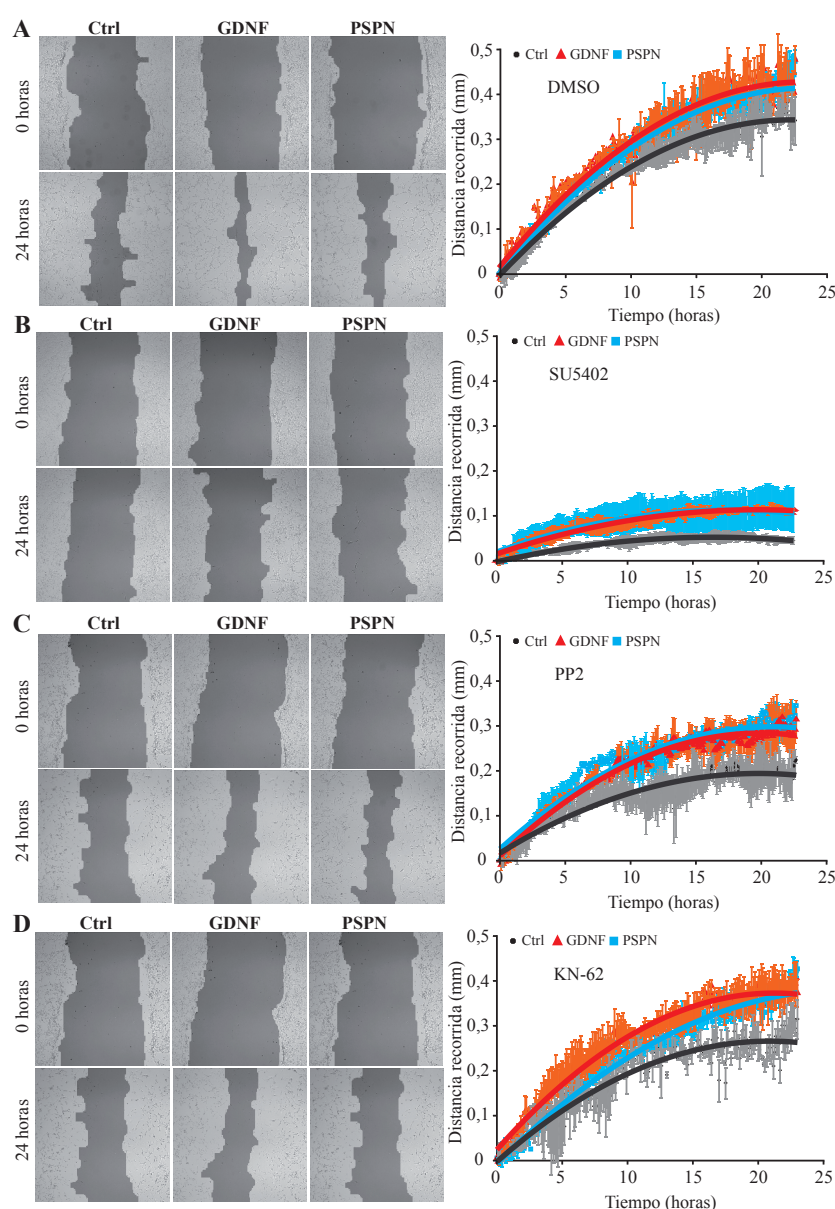
ensayo se añade DMSO al Ctrl debido a que los inhibidores utilizados se encuentran diluidos en DMSO (Figura R21A).

Ninguno de los inhibidores analizados fue capaz de prevenir el aumento en la migración de las células de Schwann provocado por



la adición de GDNF o PSPN a los cultivos. Esto llama especialmente la atención en el caso del tratamiento con SU5402, en el que ambos factores fueron capaces de producir un aumento relativo considerable en la migración de los cultivos, sobre todo teniendo en cuenta que su capacidad migratoria basal se encuentra prácticamente abolida.

Estos resultados nos permiten concluir que, si bien la actividad de CaMKII, las SLKs y, muy especialmente, la actividad de FGFR (u otras quinasas inhibidas por SU5404, como VEGFR) participan activamente en la motilidad basal de las células de Schwann, ninguna de estas rutas de señalización parecen ser las responsables de la modulación de la migración por GFLs.



**Figura R21. Efecto de la inhibición de rutas de transducción de señales dependientes de NCAM sobre la migración de SCs. (A) Migraciones con GDNF y PSPN en condiciones control. (B) Migraciones de SCs con GDNF y PSPN inhibiendo FGFR. (C) Migraciones de SCs con GDNF y PSPN al inhibir las rutas Fyn y otras SLK. (D) Migraciones de SCs con GDNF y PSPN inhibiendo la ruta de NCAM mediada por CAMKII.**





## DISCUSIÓN

El proceso de formación de mielina depende de complejas interacciones entre las SCs y las neuronas cuyos axones son mielinizados. Nuestros resultados demuestran que los miembros de la familia de los GFLs participan en las redes reguladoras que influyen en la formación de mielina en el SNP.

De acuerdo con los resultados obtenidos, una conclusión es que los distintos miembros de la familia de los GFLs participan de forma diferencial en algunos o todos los procesos del proceso de mielinización analizados (Tabla D1).

	GDNF	NRTN	ARTN	PSPN
Recubrimiento axonal	+	+	+	+
Mielinización	+	+	-	+
Migración	+	-	-	+

Tabla D1. Resumen del efecto de los distintos GFLs sobre la migración de las células de Schwann y la mielinización periférica.

GDNF es capaz de ejercer un potente efecto positivo sobre el recubrimiento axonal, así como inducir la formación de mielina, incrementando tanto la maduración como el número de los internodos formados; además de ser capaz de modular la migración de las SCs. NRTN comparte con GDNF su capacidad de actuar positivamente sobre las etapas de premielinización, incrementando el recubrimiento axonal por SCs, así como sobre la formación y maduración de la envuelta de mielina, aunque no es capaz de influir sobre la migración de las SCs aisladas. ARTN es, probablemente, el factor que presenta un comportamiento más diferenciado del resto de miembros de la familia, ya que sólo es capaz de influir sobre las etapas iniciales, produciendo un incremento en la figuras de recubrimiento obtenidas, pero sin que esto prácticamente se traduzca en un aumento posterior en la mielinización y tampoco es capaz de modular la migración de las SCs. Finalmente,

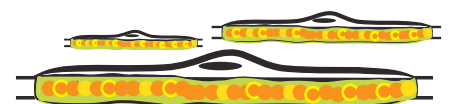
PSPN, a pesar de que tradicionalmente se le ha considerado como el miembro más diferenciado de la familia, comparte con GDNF su capacidad de producir un aumento en el recubrimiento axonal y en la maduración y formación de mielina, así como de modular la migración de las SCs.

De estos datos se concluye que la toma de decisión sobre el recubrimiento axonal (que constituye el primer proceso dentro de la formación de una envuelta de mielina), es un proceso independiente de la formación y grado de maduración final de la vaina *per se* y ambos procesos se encuentran gobernados, al menos parcialmente, por distintos miembros de la familia de GFLs.

Una segunda conclusión es que, a pesar de que los mecanismos de señalización intracelular de todos los GFLs, supuestamente pasan a través de las mismas rutas de transducción de señales, los distintos miembros de esta familia son capaces de ejercer efectos específicos diferenciales en un mismo tipo o modelo celular.

### Expresión de GFLs y sus Receptores Durante el Desarrollo del Nervio Periférico

Todos los ligandos, co-receptores de especificidad y receptores de señalización de la familia de GFLs se expresan durante el desarrollo del nervio ciático a niveles comparables o, en algunos casos, incluso muy superiores a los obtenidos en el cerebro de rata adulta. Estos hallazgos sugieren que estos factores pueden estar jugando un papel en el desarrollo del nervio ciático y, más concretamente, durante las distintas etapas del proceso de mielinización. Los resultados obtenidos de los estudios del curso temporal de expresión de los distintos GFLs durante el desarrollo del nervio ciático nos pueden aportar pistas sobre su posible funcionalidad.





Se observa que el perfil temporal de expresión nos permite catalogar a los distintos ligandos dentro de tres grupos diferenciados. Tanto GDNF y NRTN presentan niveles embrionarios (coincidente con las etapas previas a la mielinización) elevados y disminuyen de forma significativa tras el parto (a partir del cual se inicia la síntesis activa de mielina). ARTN presenta un comportamiento similar, con una disminución (aunque no tan marcada como en el caso de GDNF y NRTN) en la interfase entre la etapa embrionaria y la postnatal, manteniendo posteriormente unos niveles estables durante la etapa de mielinización activa. Por el contrario, los niveles de PSPN no solo es que no disminuyen durante el tránsito de la etapa embrionaria a la postnatal, sino que incluso llegan a aumentar y se mantienen relativamente altos durante el proceso de mielinización activa y con posterioridad (tras la finalización del proceso / mantenimiento de la mielina madura).

Igualmente, los diferentes receptores y co-receptores están presentes durante el proceso de mielinización del nervio ciático, aunque también presentan comportamientos diferentes. Se observó que GFR $\alpha$ 1, 2 y 4 se incrementan de forma pronunciada durante el proceso activo de acumulación de mielina con un pico que coincide con el momento de mayor deposición de mielina, lo que parecería indicar que pudiesen estar jugando un papel regulador durante estas etapas. Por el contrario, con respecto a GFR $\alpha$ 3, se encontró una fuerte disminución relativa de este receptor a partir de los elevados niveles presentes en las etapas embrionarias, lo que sugiere que ARTN (el ligando específico de GFR $\alpha$ 3) podría estar participando esencialmente en procesos previos a la mielinización y no tanto durante el desarrollo postnatal del nervio.

Finalmente, con respecto a los receptores señalizadores RET y NCAM, su patrón de expresión temporal es también muy diferente. Observamos un fuerte incremento de RET desde el estadio embrionario hasta el estadio

postnatal avanzado (P21) del nervio ciático de rata, mientras que ocurre lo contrario en el caso del receptor NCAM, donde a partir de estadios posteriores al nacimiento comienza a decrecer, aunque sigue manteniendo niveles relativamente altos.

La expresión de GDNF, GFR $\alpha$ 1-3, RET y NCAM en nervio ciático se había descrito con anterioridad [130] y nuestro trabajo confirma la presencia de dichos factores y sus receptores en nervio ciático. Sorprendentemente en esos mismos estudios no se pudo detectar la expresión de GFR $\alpha$ 4 ni en nervio ciático ni en SCs aisladas, aunque, en nuestras manos, presenta unos niveles de expresión muy elevados, al menos comparados con los obtenidos en cerebro de rata adulta que hemos considerado a lo largo de todo el trabajo como control de expresión de los distintos genes.

Los resultados anteriores nos sugieren que los GFLs podrían estar participando en el desarrollo del nervio ciático y, de forma más concreta, en el proceso de mielinización; pero el nervio es una estructura compleja en donde participan diversos tipos celulares, por lo que es importante tener en cuenta que los niveles de mRNA en nervio ciático provienen esencialmente de las células de Schwann, células accesorias como fibroblastos, así como de los axones más no de la parte mayoritaria de mRNA de las neuronas DRGs que no está representado en este resultado. Por todo ello, resulta importante purificar los nervios en cada componente celular requerido en este paso para la formación de mielina, para intentar determinar el origen celular concreto de la expresión observada. Cuando se analizó mediante RT-Q-PCR la expresión en cocultivos de SCs con DRGNs capaces de dar lugar a la formación de mielina, se observó que los distintos receptores presentan una expresión similar al observado en el nervio ciático, lo que nos permite en cierta medida validar la capacidad de recapitulación de estos cocultivos. El análisis de la expresión de los distintos receptores y co-receptores en cultivos



aislados de SCs o de neuronas sensoriales DRG nos permitió identificar el/los tipo/s celulares sobre el que los diferentes GFLs pudieran estar actuando.

Como puede observarse en los resultados resumidos en la Tabla D2, respecto a los co-receptores, destaca el hecho de que GFR $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3 se expresan en ambos tipos celulares, aunque con diferencias entre ellos. Así GFR $\alpha$ 1 (y en menor medida también GFR $\alpha$ 2) presenta un nivel de expresión mayor en SCs, comparado con lo obtenido en DRGNs. Por el contrario, GFR $\alpha$ 3 presenta unos niveles muchísimo más elevados en neuronas que en las células gliales. De todas formas, el resultado que destaca por encima del resto es la ausencia de expresión de GFR $\alpha$ 4 en neuronas DRGs, como había sido descrito con anterioridad [2], aunque nosotros sí que pudimos detectar la expresión de GFR $\alpha$ 4 en SCs, indicativo de que cualquier posible papel que tenga PSPN/GFR $\alpha$ 4 es mediante este tipo celular. La ausencia de GFR $\alpha$ 4 en DRGs (Ernsberger, 2008), puede explicar el porqué PSPN no tiene efectos neurotróficos sobre las DRGs.

Otro hallazgo interesante resulta ser la ausencia de receptor RET en las SCs, lo cual es indicativo de que cualquier señalización que ocurra en este tipo celular sería mediante el receptor NCAM y, adicionalmente, nos indica que el incremento de los niveles de RET durante el desarrollo del nervio ciático no está mediado por la regulación de su expresión en SCs, sino que muy probablemente se debe a su expresión en los axones de las neuronas DRGs (o motoras).

## Regulación del Proceso de Mielinización por GFLs

Una vez establecido que todos los factores, receptores y co-receptores son expresados durante el proceso de mielinización, procedimos a utilizar un modelo de cocultivos mielinizantes *in vitro* con el fin de determinar si estos factores eran capaces de regular este proceso.

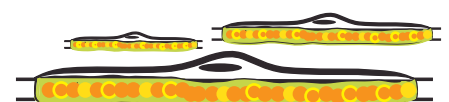
	Nervio ciático	Co-cultivos	DRGNs	SCs
<b>GNDF</b>	+	n.d.	n.d.	n.d.
<b>NRTN</b>	+	+	+	+
<b>ARTN</b>	+++	+++	++	+
<b>PSPN</b>	+	+/-	+/-	+/- -
<b>GFR-<math>\alpha</math>1</b>	++	++	+/-	++
<b>GFR-<math>\alpha</math>2</b>	++	+	+/- -	+/-
<b>GFR-<math>\alpha</math>3</b>	+++	+++	++	+/- -
<b>GFR-<math>\alpha</math>4</b>	++	+	-	+
<b>Ret</b>	+	++	++	-
<b>NCAM</b>	+	+	+	+/-

**Tabla D2.** Expresión relativa de los distintos miembros de la familia de los GFLs, su co-receptores específicos y los receptores de señalización en nervio ciático, cocultivos mielinizantes y cultivos aislados de neuronas sensoriales DRG o células de Schwann. Los valores se muestran de forma comparativa a los observados en cerebro de rata adulta.

Una conclusión es que se pueden diferenciar dos etapas en el proceso de formación de mielina que están diferencialmente reguladas por los distintos GFLs.

Primero, todos los GFLs, en mayor o menor medida, son capaces de alterar las etapas iniciales de formación de mielina, produciendo un aumento comparable en la aparición de figuras de recubrimiento axonal, identificadas mediante la aparición de estructuras morfológicas que presentan un nivel alto y homogéneo de expresión de MAG y que se encuentran posicionadas longitudinalmente a lo largo de los axones neuronales.

Segundo, GDNF, NRTN y PSPN, pero no ARTN, son capaces de incrementar la aparición de figuras de mielina madura, caracterizadas por la expresión de las proteínas presentes de



mielina MBP y P0 y la adopción de estructuras morfológicas características de la mielina madura.

Esta capacidad de modular el grado de maduración de la mielina correlaciona en gran medida con los niveles relativos de sus respectivos co-receptores en SCs. GDNF es el factor que muestra una mayor efectividad, lo que se asocia con la presencia de niveles muy elevados de GFR $\alpha$ 1 en SCs. Tanto PSPN como NRTN presentan niveles altos de sus co-receptores (GFR $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 4, respectivamente), lo que también tiene relación con una fuerte inducción en la capacidad de formar mielina madura. Finalmente, los niveles relativos más bajos de co-receptores corresponden a GFR $\alpha$ 3, lo que correlaciona con la pequeña o casi nula capacidad de ARTN, su ligando específico, para inducir la formación de mielina madura.

Asimismo, la capacidad de modular positivamente la formación de mielina de los distintos GDNF, NRTN y PSPN correlaciona con el perfil de expresión temporal durante el desarrollo del nervio ciático de sus respectivos co-receptores. GFR $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 4 presentan perfiles temporales muy similares, con una expresión máxima coincidente con el pico de disposición de mielina (aproximadamente sobre el día 8 postnatal). Por el contrario, GFR $\alpha$ 3, el receptor específico de ARTN, presenta un perfil totalmente diferente, con un máximo de expresión en las etapas prenatales que va descendiendo significativamente durante los primeros días de la vida postnatal en la que se produce el proceso de mielinización.

Otro dato a destacar es el hecho de que, si bien GDNF es capaz de producir un efecto mayor que PSPN sobre el recubrimiento axonal (MAG+) y la formación total de mielina madura (MBP+, P0+, MAG+), este último factor parece ser más efectivo en alcanzar un grado alto de maduración de los cultivos, lo que se traduce en que la mayor parte de las SCs que toman la determinación de formar mielina y empiezan a recubrir el axón (MAG+) acaben dando lugar

a figuras de mielina madura (MAG+/MBP+), provocando incluso una disminución aparente en el número de figuras de mielina inmadura (MAG+/MBP-) que todavía se encuentran en las etapas iniciales de maduración.

En un estudio realizado durante la realización de esta investigación se describió que GDNF era capaz de incrementar los niveles de formación de mielina en cocultivos, en el que se concluía hipotéticamente que su acción se producía de forma directa sobre el tipo celular DRGNs [186]. Nuestros datos no concuerdan con respecto la interpretación global de los resultados descritos por Zhang y colaboradores ya que, si bien parte del efecto obtenido puede ser debido a lo que ocurre sobre la neurona (p.e., todo el posible efecto mediado por RET), la mayor parte de este efecto positivo ha de ser mediado por la SCs. Nuestros datos soportan un modelo en el que aunque GDNF también podría actuar en la neurona (de allí que el efecto observado con este factor sea mayor que el obtenido con PSPN), por otro lado actuaría esencialmente en la SC mediante un mecanismo similar al de PSPN (aunque siempre tomando en consideración que los resultados obtenidos son valores relativos). Todo lo anterior se refuerza por la falta de efecto en la práctica de ARTN con respecto a la maduración de internodos de mielina, que debería actuar en las SCs a través de unos niveles bastante bajos de GFR $\alpha$ 3, aunque sí que aumenta significativamente la iniciación o recubrimiento inicial de los internodos de mielina, lo que significa que la determinación del recubrimiento axonal e inicio de la formación de mielina está mediado mayoritariamente, por efectos directos sobre el componente neuronal.

Así, la activación de RET en DRGNs por GDNF, NRTN o ARTN (cuyos respectivos co-receptores se expresan en las neuronas) producirían un fuerte aumento en el recubrimiento axonal, provocando cambios en el axón que lo hacen más receptivos para ser recubiertos por las SCs y, por lo tanto, iniciar el proceso de formación de mielina. Además:





GDNF, NRTN y PSPN; podrían actuar mediante NCAM en la SC provocando un aumento en el ritmo de la mielinización per se; con lo cual se incrementaría la “maduración” de los internodos de mielina.

### **Independencia de Sustrato en la Regulación de la Mielinización por GFLs**

El modelo de cocultivos utilizado en este estudio se estableció con Matrigel como sustrato, siendo éste, rico en diversos componentes de la matriz extracelular (esencialmente laminina y colágeno) que, junto con los factores trópicos presentes en este preparado complejo, pueden ser capaces de inducir o modular por si solos efectos en la formación de mielina.

Es por ello que se realizó el estudio de la modulación de la formación de mielina por GDNF y PSPN en cocultivos hermanos establecidos a partir de las misma camadas de ratas para la obtención de DRGNs y las mismas preparaciones de SCs en diferentes condiciones de sustrato. En todos los casos se obtuvieron cocultivos muy similares entre si, con respecto a la red axonal, aunque algunos sustratos eran más permisivos que otros a la hora de obtener una buena mielinización basal; pero, en cualquier caso, los resultados para ambos factores eran capaces de ser reproducidos en todos los sustratos analizados (tanto con la mezcla compleja de factores presente en la Matrigel, como sobre los sustratos más simples colágeno, laminina o fibronectina), lo que permite aseverar que la regulación del proceso de formación de mielina por GDNF y PSPN encontrada en cocultivos sobre Matrigel es un fenómeno que no depende del sustrato utilizado, independientemente de otras características que presentan los diversos sustratos, tales como la capacidad inicial de adhesión celular, que era más alta en Matrigel por lo que facilita sobremana el establecimiento y mantenimiento de los cultivos, y que fue determinante para el uso

continuado de esta preparación como sustrato en los experimentos realizados.

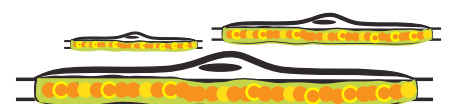
De hecho, los efectos obtenidos con GDNF y PSPN pueden apreciarse más claramente utilizando fibronectina como sustrato, aunque en realidad esto se debe a que la formación de mielina basal se ve mucho menos favorecida que en el resto de condiciones estudiadas; pero, la extrema dificultad en el correcto establecimiento y mantenimiento de los cocultivos, debido, principalmente, a los problemas de adhesión que tienen los axones a los pocillos de la placa, hace que este sustrato no sea el óptimo para la realización de este tipo de estudios.

### **GDNF y PSPN Modulan la Formación de Mielina Independiente de NGF**

Como se ha indicado, durante la realización de este estudio se describió por otros autores la capacidad de GDNF de potenciar la formación de mielina, aunque usando un sistema de cocultivos mielinizantes que difiere bastante del nuestro [184]. Por ello, se pretendió replicar algunos de los elementos propios de estos ensayos (especialmente la ausencia de NGF en los cultivos), en espera de que nos pudiesen ofrecer otra perspectiva con respecto a la actuación de GDNF y adicionalmente de PSPN.

Con este experimento se observó que, aún cuando las condiciones de formación de mielina son muy poco favorables en ausencia de NGF, y la cantidad de mielina madura obtenida en nuestro caso fue mucho menor del descrito inicialmente [186], sí que pudimos apreciar los efectos positivos que tiene GDNF y expandir estos resultados a PSPN en la mielinización en ausencia de NGF.

Estos datos confirman lo que habíamos descrito en el laboratorio con anterioridad sobre la importancia del NGF para la formación de mielina y que, en consecuencia, en ausencia



de este factor resulta muy difícil encontrar mielina en cocultivos [28].

De hecho, es en estas condiciones de ausencia de NGF en las que las diferencias entre PSPN y GDNF son más obvias. Mientras que en las condiciones permisivas para la formación de mielina de nuestros cocultivos en presencia de NGF y suero el efecto de PSPN es siempre inferior al de GDNF, el grado de mielinización de los cocultivos sigue siendo comparable. Por el contrario, en ausencia de NGF y suero, GDNF produce un aumento significativamente muy superior al obtenido con PSPN, lo que de nuevo argumenta a favor de que GDNF participe en el proceso de formación de mielina a un doble nivel a través de la modulación de la capacidad de la neurona DRG para ser mielinizadas y de la capacidad de la SC para dar lugar a una envuelta de mielina madura, mientras que el mecanismo de actuación de PSPN se limitaría esencialmente a potenciar la capacidad mielinogénica de la SC.

### **Implicación de GFLs-Ret en la Regulación del Proceso de Mielinización Periférica**

La vía canónica de transducción de señales para los distintos GFLs pasa por la activación del receptor tirosina quinasa Ret. Con objeto de determinar la posible contribución de esta ruta de señalización en la regulación de la formación de mielina por GDNF y PSPN, se analizó el efecto de la adición de un inhibidor de RET sobre cocultivos pretratados con ambos factores, obteniéndose resultados diferentes. Así, mientras que la inducción de la mielinización por parte de GDNF es parcialmente dependiente de la ruta canónica para este factor, no ocurre lo mismo para PSPN. Esto nos indica que aunque la activación de Ret por GDNF tiene un efecto positivo sobre la formación de mielina, la mayor parte del efecto regulador de los GFLs resultan independientes de esta vía canónica mediada por Ret, lo que implica que la posible ruta candidata a ejercer

función de la transducción de señal de este factor es NCAM.

### **Implicación de GFLs-NCAM en la Regulación de la Mielinización Periférica**

Los mecanismos de señalización no canónicos de los GFLs a través de la activación de NCAM son relativamente más complejos, ya que se ha descrito que dependen de la participación de diversas rutas de transducción de señales.

Una de las rutas de señalización vía NCAM es la mediada por la activación de FGFR. El bloqueo de esta ruta mediante el uso del inhibidor químico SU5402 nos permite deducir, en primer lugar, que la actividad basal de FGFR (o la de otra quinasa inhibida por SU5402, como es VEGFR), es necesaria para la formación de la mielina en condiciones basales, ya que el nivel de mielinización alcanzado en presencia del inhibidor en condiciones control está disminuido.

La implicación de FGFR en el proceso de mielinización periférica es algo compleja. Aunque se ha descrito que la disrupción génica de FGFR1 o FGFR2 en SCs origina una neuropatía que afecta esencialmente a los axones no mielinizados del nervio periférico [58], la deficiencia en FGF-2 produce un aumento en el número de axones mielinizados capaces de regenerar tras lesión del nervio periférico, mientras que su sobreexpresión produce una disminución en el grosor de la mielina regenerada, concomitante a un aumento en la proliferación de las SCs [69]. Esto parecería indicar que la activación de FGFR por su ligando actuaría como un regulador negativo del proceso de mielinización, lo cual no concordaría en principio con los efectos obtenidos con SU5402 en condiciones basales. Desgraciadamente, la especificidad de SU5402 no es total, ya que también se ha descrito que es capaz de inhibir la actividad tirosina quinasa de VEGFR que, a su vez, también se ha visto implicado en la regeneración del



nervio ciático, posiblemente mediante un mecanismo complejo que se ha atribuido a una combinación de capacidades de su ligando VEGF, tales como un aumento en la angiogénesis, sumado a efectos neurotróficos y neuroprotectores [128]. Con la finalidad de discernir si los efectos debidos a SU5402 están mediados por la inhibición de FGFR o VEGFR, se tendría que recurrir a otro tipo de aproximación experimental, tales como el uso de shRNAs específicos contra VEGFR o FGFR mediante infección por lentivirus de las SCs objeto a estudio.

El dato más interesante de estos estudios es el hecho de que en presencia de SU5402, a pesar de que produzca una reducción parcial en la capacidad de formar mielina de los cultivos en condiciones basales, no tan sólo no se produjo una disminución en la actividad mielinogénica de GDNF y PSPN, sino que incluso fue capaz de potenciar esta actividad, de forma especialmente evidente para el GDNF. Esto nos permite desenmascarar una actividad inhibitoria de la mielinización mediada por GFLs-NCAM-FGFR que, en este caso sí, podría en cierta medida ser reminiscente del efecto negativo sobre la mielinización antes mencionada que ejerce el eje FGF-FGFR.

Otro dato adicional es el de la contribución relativa de esta vía inhibitoria a los efectos globales de GDNF y PSPN, por lo que podríamos especular sobre las causas que conllevan a que el aumento en cocultivos tratados con GDNF sea mucho mayor comparativamente que en aquellos tratados con PSPN. Todo lo anterior podría explicarse si esta ruta de señalización actúa directamente en ambos tipos celulares (DRGNs y SCs) en el caso de GDNF, ya que ambos expresan los co-receptores específicos para este factor, y de este modo la menor potenciación del efecto obtenido con PSPN se deba a que uno de los dos tipos celulares que interviene en los cocultivos, en este caso las DRGNs, carezca de su co-receptor específico GFR $\alpha$ 4. Esto explicaría las diferencias en la capacidad pro-mielinogénica de estos dos

factores aún cuando ambos están elevados con respecto a los niveles basales en cuestión. Por eso el efecto es más dramático para GDNF (que puede actuar en ambos lados).

Otra de las rutas de transducción de señales que participan en los efectos fisiológicos de los GFLs mediados por NCAM actúa a través de la activación de CaMKII. El uso de un inhibidor específico de esta quinasa nos ha permitido desenmascarar el papel esencial que CaMKII ejerce en la formación de mielina periférica en condiciones control.

Curiosamente, aunque la inhibición de CaMKII prácticamente elimina la formación de mielina, GDNF (pero no PSPN) todavía es capaz de ejercer un cierto efecto positivo, contrarrestando muy parcialmente la inhibición mediada por el tratamiento con KN62. Esto podría indicar que esta ruta no estaría implicada al menos en parte de la actividad pro-mielinogénica de este factor. Esto puede deberse a que aún persista el efecto positivo RET-dependiente en las neuronas que actúa sólo para el GDNF; mientras CaMKII resultaría necesaria para la fisiología de SCs y/o la actividad de los GFLs en este tipo celular; aunque no es posible afirmarlo fehacientemente debido a la drástica reducción de los valores basales.

Finalmente, la otra gran ruta de transducción de señales implicada en la señalización de NCAM es la SLK Fyn. Nuestros resultados indican que Fyn, u otro/s miembro/s de la familia Src, se encuentra implicada en el proceso de determinación de la longitud de los internodos y, en cierta medida de su grado de maduración. Mediante la inhibición de esta ruta con PP2 podemos observar como se produce una dramática reducción del tamaño de los internodos de mielina. Por otro lado existe un cierto incremento en el grado de maduración de los internodos formados.

Estos resultados concuerdan parcialmente con los efectos descritos por Hossain y colaboradores durante la realización de esta tesis, que en los que se describió una



disminución en el tamaño de los internodos en presencia de este inhibidor específico de SLKs, aunque la mielina formada presenta una compactación normal [77].

Adicionalmente, en ese estudio se concluía que el rol de iniciación de la formación de mielina periférica se encuentra mediado por la activación de p38, Akt y ERK, lo cual regula la expresión de Krox-20 y la mielinización periférica. La principal diferencia en los resultados de ese estudio y los del presente trabajo se encuentra en que Hossain y colaboradores concluyen que, conjuntamente con la reducción del tamaño, se produce una inhibición en el número de internodos formados; mientras que en nuestras manos no sólo no se observa esta disminución en el número de internodos basal, sino que incluso hay un aumento en el número de figuras de mielina madura MBP+ obtenidas. Esta discrepancia quizá se deba a las diferencias en los tiempos de tratamiento ya que el inhibidor de la ruta Fyn (PP2) es añadido 30 minutos previos a la inducción con ácido ascórbico en los trabajos de Hossain y colaboradores, mientras que en nuestro ensayo se realizó un tratamiento con el inhibidor de 48h previas a la inducción con ácido ascórbico; este hecho puede también explicar que parece que tengamos una mayor reducción aparente en el tamaño de los internodos (de acuerdo a la comparativa visual de las imágenes).

En cualquier caso, quizás la diferencia más importante entre ambos estudios radica en que mientras Hossain y colaboradores utilizaban explantes disociados y mantenidos en medio libre de suero, nosotros utilizamos cocultivos purificados de SCs con neuronas DRGs. Esto supone que sus cultivos sean más inmaduros que los nuestros y, sobre todo, que no se encuentren sincronizados de modo que la disminución en la cantidad de mielina obtenida que se observa en los experimentos de este grupo puede ser debido a que la inhibición de las SLKs por PP2 afecte de alguna manera también a algunas de las fases previas a la formación de mielina (incluyendo la

maduración de la red axonal o la proliferación de las SCs) que en los explantes disociados siguen ocurriendo durante el ensayo, mientras que en nuestro caso ya han transcurrido con normalidad al poder diseccionar con mayor precisión las distintas fases.

Sin embargo, el punto más relevante que se puede deducir de estos resultados radica en que, en presencia de PP2, tanto el GDNF como, incluso en mayor medida, la PSPN pierden su capacidad de incrementar la formación de mielina, pasando incluso a producir una inhibición del proceso, de nuevo de forma más acusada para PSPN. Esto es indicativo de que la ruta de señalización vía GFLs-NCAM-Fyn resulta crucial para los efectos positivos globales observados con estos factores con respecto a mielinización.

## **Mecanismos de Regulación de la Mielinización Periférica por GFLs**

Como se resume en la Figura D1, los mecanismos de regulación de la mielinización periférica por GFLs es un fenómeno complejo en el que participan distintas rutas de señalización intracelular en los dos tipos celulares implicados.

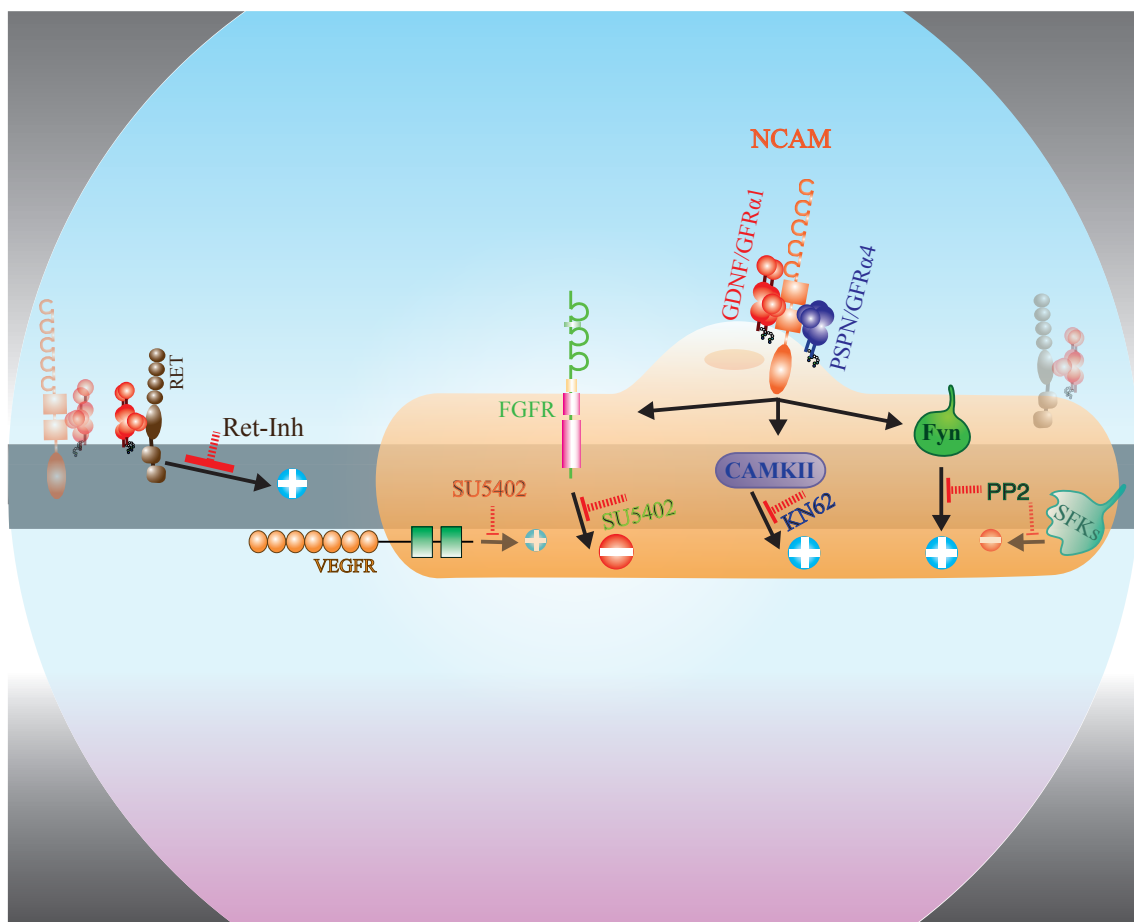
Por una parte, la unión de GDNF a Ret, presente únicamente en la neurona, tiene un efecto positivo sobre la mielinización, probablemente relacionado con la capacidad neurotrófica de este ligando en neuronas sensoriales. Es de suponer, aunque no ha sido comprobado, que este efecto pro-mielinogénico del GDNF esté compartido también por ARTN y NRTN, aunque no así por PSPN debido a la ausencia de receptor específico GFR $\alpha$ 4 en el componente neuronal. El hecho de que ARTN prácticamente no tenga un efecto sobre el proceso de maduración de la envuelta de mielina y afecte esencialmente al recubrimiento axonal, a pesar de que su receptor específico GFR $\alpha$ 3 se exprese adecuadamente en neuronas (siempre teniendo en cuenta que los niveles de



expresión detectados son sólo relativos), nos permite especular que, muy probablemente, el efecto principal de la activación de Ret en neuronas DRGs sea el de facilitar el proceso de formación de mielina aumentando la receptividad del axón a su recubrimiento y mielinización por SCs, de forma similar a como el NGF actúa como un factor discriminador entre mielinización periférica y central [28].

Por otro lado, el papel principal como traductor de la señal de los distintos GFLs sobre la formación de mielina es llevado a cabo por el receptor no canónico NCAM, probablemente a través de su activación en SCs, aunque no pueda descartar que en parte sea capaz de actuar también sobre el componente neuronal. El mecanismo de actuación de NCAM es altamente complejo ya que al menos dos, sino tres, rutas de transducción de señales

dependientes de NCAM son capaces de participar en el proceso de mielinización. La ruta GFL-NCAM-FGFR tiene un efecto negativo sobre la formación de mielina, que sólo queda al descubierto cuando no queda contrarrestado por el efecto pro-mielinogénico que presenta la ruta GFL-NCAM-Fyn. Asimismo, nuestros resultados nos han permitido identificar el papel destacado que CaMKII tiene sobre el proceso de mielinización en general, aunque no podamos saber con certeza si su regulación por la vía GFLs-NCAM participa o no de esta regulación. Colateralmente, nuestros datos nos han permitido desenmascarar el posible papel regulador de otras dos rutas independientes de GFLs, como son, previsiblemente, la de VEGFR (u otra quinasa sensible a SU5402), que tiene una capacidad pro-mielinogénica



**Figura D1. Rutas de señalización implicadas en el proceso de formación de mielina periférica.** De acuerdo a los estudios realizados en distintos miembros de la familia de los GFLs, su co-receptores específicos y los receptores de señalización en nervio ciático, cocultivos mielinizantes y cultivos aislados de neuronas sensoriales DRG o células de Schwann se obtiene un extenso mecanismo de regulación de la formación de mielina periférica por parte de los GFLs.





clara, y la del resto de las SLKs distintas de Fyn que, en condiciones basales como inhibidores de la mielinización periférica.

## **Regulación de la Migración de las SCs por GFLs**

Un efecto de los GFLs, adicional al de la formación de la envuelta de mielina, es el de la modulación de la velocidad de migración *in vitro* de las SCs aisladas, lo cual sólo puede explicarse por un efecto directo sobre este tipo celular.

Hemos observado que las SCs expresan GFR $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 y  $\alpha$ 4, así como NCAM; mientras que carecen de receptor RET. Las descripciones presentes en la literatura se limitaban a demostrar el hecho de que GDNF ejerce sus efectos sobre las SCs a través de su unión a GFR $\alpha$ 1 y NCAM, ya que este tipo celular no expresa RET [81], habiéndose descrito que GDNF es capaz de producir un aumento en la motilidad de las SCs [126]. No existen, por el contrario, estudios exhaustivos sobre el efecto del resto de los GFLs en este tipo celular, aunque se había descrito la presencia de GFR $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3 en SCs, aunque no así de GFR $\alpha$ 4 [130]. El motivo de esta discrepancia es desconocido, aunque el hecho de que PSPN, que puede actuar únicamente a través de este receptor, sea capaz de modular la migración de las SCs refuerza la idea de que GFR $\alpha$ 4 funcional se expresa en SCs, al contrario de lo descrito anteriormente en la literatura.

En cualquier caso, el hecho de que distintos GFLs tengan un efecto diferente sobre la migración de las SCs, de modo que GDNF y PSPN modulan su migración mientras que NRTN y ARTN no sean capaces de hacerlo, puede indicar que, o bien los mecanismos de señalización intracelular vía GFL-GFR $\alpha$ -NCAM son diferentes para cada GFR $\alpha$  en particular, o bien que se necesita un nivel mínimo de expresión de ese GFR $\alpha$  en particular, lo que podría estar de acuerdo con el hecho de que la expresión, siempre relativa,

de GFR $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3 parece ser menor que la de GFR $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 4.

El uso de inhibidores de las distintas rutas de transducción de señales activados por NCAM nos han permitido determinar que ninguna de las estudiadas (Fyn, FGFR y CamKII) parece ser la responsable de la modulación de la migración debido a GDNF o PSPN. Nuestros resultados sí que nos han permitido comprobar que Fyn (u otras quinasas de la familia) participan en la migración basal de las SCs, pero tanto GDNF como PSPN siguen siendo capaces de incrementar la migración de las SCs en presencia de su inhibidor. En la descripción inicial del aumento en la migración de SCs por GDNF [126], se describió que el mecanismo de señalización implicado en el proceso implicaba la activación de Fyn por NCAM. Nuestros datos no avalan estos resultados, aunque sí explican por qué Paratcha y colaboradores pudieron obtener este resultado artefactual, ya que en su caso no determinaron el efecto que la inhibición de esta ruta pudiera tener sobre la migración basal. Efectivamente, en presencia de PP2, el inhibidor de Fyn, la migración inducida por GDNF coincide con la obtenida en condiciones basales en ausencia del inhibidor, pero ello se debe única y exclusivamente a que se parte de unos niveles basales más bajos en presencia del inhibidor.

Un dato sorprendente del estudio es el obtenido con el inhibidor de FGFR (y también de VEGFR) SU5402, que prácticamente elimina totalmente la movilidad de las SCs, aunque mediante un mecanismo aparentemente independiente de los GFLs, ya que tanto GDNF como PSPN siguen siendo capaces de incrementar su motilidad, aunque sin llegar a restaurar los niveles normales de motilidad de este tipo celular.

## **Implicaciones Fisiopatológicas**

El campo de estudio sobre los posibles procesos en los que pueden participar los GFLs es un tema de gran actualidad; sin embargo, su descripción



aún es relativamente reciente e implica que queda un largo camino por recorrer para dilucidar sus funciones concretas, con objeto de conocer a fondo sus mecanismos de acción en las afecciones del sistema nervioso en las que están involucrados. A los distintos aspectos de la supervivencia y funcionalidad del sistema nervioso hasta el momento conocidos, se añade la implicación de los GFLs como reguladores del proceso de mielinización periférica y de la

motilidad de las SCs descrito en este trabajo. Ello implica que la modulación ejercida por los miembros de esta familia podría ayudar en el mantenimiento de la integridad de la envuelta de mielina o su recuperación en enfermedades desmielinizantes como la enfermedad de Charcot-Marie Tooth y otras neuropatías periféricas asociadas con enfermedades que cursan con pérdida de mielina, como la diabetes.







## CONCLUSIONES

1. Los diferentes GFLs, los co-receptores específicos GFR $\alpha$ 1-4 y los receptores de señalización Ret y NCAM se encuentran presentes durante el desarrollo del nervio ciático. Su expresión se regula de forma diferencial durante las etapas claves del proceso de mielinización.
2. Las SCs expresan NCAM y carecen del receptor Ret. Aunque todos los co-receptores de GFLs se expresan en SCs, la expresión es más elevada en el caso de GFR $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 4; seguidos de co-receptor GFR $\alpha$ 2, mientras que se detecta poco el co-receptor GFR $\alpha$ 3.
3. No se detecta la expresión del co-receptor GFR $\alpha$ 4 en neuronas sensoriales, que sí expresan el resto de co-receptores GFR $\alpha$ 1-3. Tanto Ret como NCAM se expresan en DRGNs.
4. GDNF, NRTN, ARTN y, en mucha menor medida, PSPN aumentan el grado de recubrimiento axonal. GDNF, NRTN y PSPN, pero no ARTN, son efectores positivos del proceso de mielinización periférica.
- v
5. El efecto positivo de GDNF sobre el proceso de mielinización periférica es parcialmente dependiente de la señalización canónica vía Ret, mientras que la totalidad del efecto de PSPN sobre el proceso de mielinización periférica es independiente de Ret.
6. La actividad de FGFR, o posiblemente VEGFR, tiene un efecto positivo sobre la formación de mielina basal. La activación de la ruta GFL/GFR $\alpha$ -NCAM-FGFR participa en una ruta anti-mielinogénica activada por GDNF y PSPN.
7. La actividad de CaMKII es imprescindible para el correcto devenir del proceso de mielinización periférica, aunque parcialmente dispensable para los efectos positivos de GDNF.
8. Las SLKs participan en el proceso de formación de mielina basal regulando tanto la longitud como el número de internodos formados. La activación de la ruta GFL/GFR $\alpha$ -NCAM -Fyn constituye la principal ruta pro-mielinogénica activada por GDNF y PSPN.
9. GDNF y PSPN, pero no así ARTN y NRTN, modulan la migración de las SCs. Ninguno de los GFLs regula la proliferación de las SCs.
10. Tanto CaMKII como los SFKs y, muy especialmente, FGFR (u otra quinasa inhibida por SU5402, como podría ser VEGFR) son requeridas para la migración basal de las SCs. Ninguna de estas rutas de transducción de señales dependientes de NCAM participa en la regulación positiva de la migración mediada por GDNF o PSPN.





# **BIBLIOGRAFÍA**

1. Adlkofer, K. and C. Lai, Role of neuregulins in glial cell development. *Glia*, 2000. 29(2): p. 104-11.
2. Airaksinen, M.S. and M. Saarma, The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci*, 2002. 3(5): p. 383-94.
3. Airaksinen, M.S., A. Titievsky, and M. Saarma, GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci*, 1999. 13(5): p. 313-25.
4. Akerud, P., et al., Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin on developing and adult substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neurochem*, 1999. 73(1): p. 70-8.
5. Alessandra Santos-Silva<sup>1</sup>, Richard Fairless<sup>1,\*</sup>, Margaret C. Frame<sup>2</sup>, Paul Montague<sup>1</sup>, George M. Smith<sup>4</sup>, Andrew Toft<sup>3</sup>, John S. Riddell<sup>3</sup>, and Susan C. Barnett<sup>1</sup>, FGF/Heparin Differentially Regulates Schwann Cell and Olfactory Ensheathing Cell Interactions with Astrocytes: A Role in Astrocytosis. *The Journal of Neuroscience*, 4 July 2007. 27(27): p. 7154-7167.
6. Amiel, J., et al., Mutations of the RET-GDNF signaling pathway in Ondine's curse. *Am J Hum Genet*, 1998. 62(3): p. 715-7.
7. Amoureux, M.C., et al., N-CAM binding inhibits the proliferation of hippocampal progenitor cells and promotes their differentiation to a neuronal phenotype. *J Neurosci*, 2000. 20(10): p. 3631-40.
8. Arce, V., et al., Synergistic effects of schwann- and muscle-derived factors on motoneuron survival involve GDNF and cardiotrophin-1 (CT-1). *J Neurosci*, 1998. 18(4): p. 1440-8.
9. Arenas, E., et al., GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron*, 1995. 15(6): p. 1465-73.
10. Arroyo, E.J. and S.S. Scherer, On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol*, 2000. 113(1): p. 1-18.
11. Bacallao, K. and P.V. Monje, Opposing roles of PKA and EPAC in the cAMP-dependent regulation of schwann cell proliferation and differentiation [corrected]. *PLoS One*, 2013. 8(12): p. e82354.
12. Baloh, R.H., et al., The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol*, 2000. 10(1): p. 103-10.
13. Baloh, R.H., et al., TrnR2, a novel receptor that mediates neurturin and GDNF signaling through Ret. *Neuron*, 1997. 18(5): p. 793-802.
14. Baloh, R.H., et al., Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron*, 1998. 21(6): p. 1291-302.
15. Barisic, N., et al., Charcot-Marie-Tooth disease: a clinico-genetic confrontation. *Ann Hum Genet*, 2008. 72(Pt 3): p. 416-41.

16. Barroso-Chinea, P., et al., Striatal expression of GDNF and differential vulnerability of midbrain dopaminergic cells. *Eur J Neurosci*, 2005. 21(7): p. 1815-27.
17. Baudet, C., et al., Positive and negative interactions of GDNF, NTN and ART in developing sensory neuron subpopulations, and their collaboration with neurotrophins. *Development*, 2000. 127(20): p. 4335-44.
18. Baudet, C., et al., Retrograde signaling onto Ret during motor nerve terminal maturation. *J Neurosci*, 2008. 28(4): p. 963-75.
19. Beenken, A. and M. Mohammadi, The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2009. 8(3): p. 235-53.
20. Beggs, H.E., et al., NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125(fak) and the SRC-related tyrosine kinase p59(fyn). *J Biol Chem*, 1997. 272(13): p. 8310-9.
21. Bennett, D.L., et al., A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. *J Neurosci*, 1998. 18(8): p. 3059-72.
22. Bennett, M.K., N.E. Erondur, and M.B. Kennedy, Purification and characterization of a calmodulin-dependent protein kinase that is highly concentrated in brain. *J Biol Chem*, 1983. 258(20): p. 12735-44.
23. Birchmeier, C. and K.A. Nave, Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation. *Glia*, 2008. 56(14): p. 1491-7.
24. Bornstein, M.B., Reconstituted rattail collagen used as substrate for tissue cultures on coverslips in Maximow slides and roller tubes. *Lab Invest*, 1958. 7(2): p. 134-7.
25. Buj-Bello, A., et al., GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron*, 1995. 15(4): p. 821-8.
26. Cacalano, G., et al., GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney. *Neuron*, 1998. 21(1): p. 53-62.
27. Chan, J.R., et al., Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(25): p. 14661-8.
28. Chan, J.R., et al., NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron*, 2004. 43(2): p. 183-91.
29. Chen, S.R. and Y.X. Liu, Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction*, 2015. 149(4): p. R159-67.
30. Cheng, L., et al., Control of Schwann cell survival and proliferation: autocrine factors and neuregulins. *Mol Cell Neurosci*, 1998. 12(3): p. 141-56.
31. Chipman, P.H., M. Schachner, and V.F. Rafuse, Presynaptic NCAM is required for motor neurons to functionally expand their peripheral field of innervation in partially denervated muscles. *J Neurosci*, 2014. 34(32): p. 10497-510.
32. Choi-Lundberg, D.L. and M.C. Bohn, Ontogeny and distribution of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in rat. *Brain Res Dev Brain Res*, 1995. 85(1): p. 80-8.

## BIBLIOGRAFÍA

33. Cohen, S., R. Levi-Montalcini, and V. Hamburger, A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1954. 40(10): p. 1014-8.
34. Cosgaya, J.M., J.R. Chan, and E.M. Shooter, The neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup> as a positive modulator of myelination. *Science*, 2002. 298(5596): p. 1245-8.
35. Culpier, M., J. Anders, and C.F. Ibanez, Coordinated activation of autophosphorylation sites in the RET receptor tyrosine kinase: importance of tyrosine 1062 for GDNF mediated neuronal differentiation and survival. *J Biol Chem*, 2002. 277(3): p. 1991-9.
36. Court, F.A., L. Wrabetz, and M.L. Feltri, Basal lamina: Schwann cells wrap to the rhythm of space-time. *Curr Opin Neurobiol*, 2006. 16(5): p. 501-7.
37. Cremer, H., et al., Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature*, 1994. 367(6462): p. 455-9.
38. Cully, M., et al., Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(3): p. 184-92.
39. Degl'Innocenti, D., et al., Differential requirement of Tyr1062 multidocking site by RET isoforms to promote neural cell scattering and epithelial cell branching. *Oncogene*, 2004. 23(44): p. 7297-309.
40. Ditlevsen, D.K., V. Berezin, and E. Bock, Signalling pathways underlying neural cell adhesion molecule-mediated survival of dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci*, 2007. 25(6): p. 1678-84.
41. Ditlevsen, D.K. and K. Kolkova, Signaling pathways involved in NCAM-induced neurite outgrowth. *Adv Exp Med Biol*, 2010. 663: p. 151-68.
42. Ditlevsen, D.K., et al., NCAM-induced intracellular signaling revisited. *J Neurosci Res*, 2008. 86(4): p. 727-43.
43. Doherty, P., et al., Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell*, 1991. 67(1): p. 21-33.
44. Dong, Z., et al., Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron*, 1995. 15(3): p. 585-96.
45. Downward, J., PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol*, 2004. 15(2): p. 177-82.
46. Durick, K., et al., Mitogenic signaling by Ret/ptc2 requires association with enigma via a LIM domain. *J Biol Chem*, 1996. 271(22): p. 12691-4.
47. Eketjall, S., et al., Distinct structural elements in GDNF mediate binding to GFR $\alpha$ 1 and activation of the GFR $\alpha$ 1-c-Ret receptor complex. *Embo J*, 1999. 18(21): p. 5901-10.
48. Engelman, J.A., J. Luo, and L.C. Cantley, The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*, 2006. 7(8): p. 606-19.
49. Enomoto, H., et al., RET signaling is essential for migration, axonal growth and axon guidance of developing sympathetic neurons. *Development*, 2001. 128(20): p. 3963-74.
50. Erickson, J.T., T.A. Brosenitsch, and D.M. Katz, Brain-derived neurotrophic factor



and glial cell line-derived neurotrophic factor are required simultaneously for survival of dopaminergic primary sensory neurons in vivo. *J Neurosci*, 2001. 21(2): p. 581-9.

51. Eswarakumar, V.P., I. Lax, and J. Schlessinger, Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005. 16(2): p. 139-49.

52. Falls, D., Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Experimental Cell Research*, 2003. 284(1): p. 14-30.

53. Friede, R.L., Control of myelin formation by axon caliber (with a model of the control mechanism). *J Comp Neurol*, 1972. 144(2): p. 233-52.

54. Fukuda, T., K. Kiuchi, and M. Takahashi, Novel mechanism of regulation of Rac activity and lamellipodia formation by RET tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 2002. 277(21): p. 19114-21.

55. Fundin, B.T., et al., A rapid and dynamic regulation of GDNF-family ligands and receptors correlate with the developmental dependency of cutaneous sensory innervation. *Development*, 1999. 126(12): p. 2597-610.

56. Furdui, C.M., et al., Autophosphorylation of FGFR1 kinase is mediated by a sequential and precisely ordered reaction. *Mol Cell*, 2006. 21(5): p. 711-7.

57. Furley, A.J., et al., The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell*, 1990. 61(1): p. 157-70.

58. Furusho, M., et al., Disruption of fibroblast growth factor receptor signaling in nonmyelinating Schwann cells causes sensory axonal neuropathy and impairment of thermal pain sensitivity. *J Neurosci*, 2009. 29(6): p. 1608-14.

59. Garbay, B., et al., Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol*, 2000. 61(3): p. 267-304.

60. Garbayo, E., et al., Effective GDNF brain delivery using microspheres--a promising strategy for Parkinson's disease. *J Control Release*, 2009. 135(2): p. 119-26.

61. Garces, A., et al., GFRalpha 1 is required for development of distinct subpopulations of motoneuron. *J Neurosci*, 2000. 20(13): p. 4992-5000.

62. Garcia, Z., et al., Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division. *EMBO J*, 2006. 25(4): p. 655-61.

63. Gillies, R.J., N. Didier, and M. Denton, Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem*, 1986. 159(1): p. 109-13.

64. Glenn, T.D. and W.S. Talbot, Analysis of Gpr126 function defines distinct mechanisms controlling the initiation and maturation of myelin. *Development*, 2013. 140(15): p. 3167-75.

65. Golden, J.P., et al., Expression of neurturin, GDNF, and their receptors in the adult mouse CNS. *J Comp Neurol*, 1998. 398(1): p. 139-50.

66. Gomez, T.M. and N.C. Spitzer, Regulation of growth cone behavior by calcium: new dynamics to earlier perspectives. *J Neurobiol*, 2000. 44(2): p. 174-83.

## BIBLIOGRAFÍA

67. Grinspan, J.B., et al., Axonal interactions regulate Schwann cell apoptosis in developing peripheral nerve: neuregulin receptors and the role of neuregulins. *J Neurosci*, 1996. 16(19): p. 6107-18.
68. Grondin, R. and D.M. Gash, Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): a drug candidate for the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol*, 1998. 245(11 Suppl 3): p. P35-42.
69. Grothe, C., K. Haastert, and J. Jungnickel, Physiological function and putative therapeutic impact of the FGF-2 system in peripheral nerve regeneration--lessons from in vivo studies in mice and rats. *Brain Res Rev*, 2006. 51(2): p. 293-9.
70. Hamilton, J.F., et al., Heparin coinfusion during convection-enhanced delivery (CED) increases the distribution of the glial-derived neurotrophic factor (GDNF) ligand family in rat striatum and enhances the pharmacological activity of neurturin. *Exp Neurol*, 2001. 168(1): p. 155-61.
71. Harder, T. and K. Simons, Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol*, 1997. 9(4): p. 534-42.
72. Hawkins, P.T., T.R. Jackson, and L.R. Stephens, Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> by activating a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> 3-OH kinase. *Nature*, 1992. 358(6382): p. 157-9.
73. Hayashi, H., et al., Characterization of intracellular signals via tyrosine 1062 in RET activated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Oncogene*, 2000. 19(39): p. 4469-75.
74. Hempstead, B.L., Coupling neurotrophins to cell migration through selective guanine nucleotide exchange factor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(16): p. 5645-6.
75. Henderson, C.E., et al., GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science*, 1994. 266(5187): p. 1062-4.
76. Heuckeroth, R.O., et al., Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron*, 1999. 22(2): p. 253-63.
77. Hossain, S., et al., Regulation of peripheral myelination by Src-like kinases. *Exp Neurol*, 2010. 226(1): p. 47-57.
78. Houldsworth, J., et al., Expression profiling of lineage differentiation in pluripotential human embryonal carcinoma cells. *Cell Growth Differ*, 2002. 13(6): p. 257-64.
79. Howe, D.G. and K.D. McCarthy, Retroviral inhibition of cAMP-dependent protein kinase inhibits myelination but not Schwann cell mitosis stimulated by interaction with neurons. *J Neurosci*, 2000. 20(10): p. 3513-21.
80. Ikonen, E. and K. Simons, Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells. *Semin Cell Dev Biol*, 1998. 9(5): p. 503-9.
81. Iwase, T., et al., Glial cell line-derived neurotrophic factor-induced signaling in Schwann cells. *J Neurochem*, 2005. 94(6): p. 1488-99.
82. Jessen, K.R. and R. Mirsky, The origin and development of glial cells in peripheral

- nerves. *Nat Rev Neurosci*, 2005. 6(9): p. 671-82.
83. Jessen, K.R., R. Mirsky, and L. Morgan, Role of cyclic AMP and proliferation controls in Schwann cell differentiation. *Ann N Y Acad Sci*, 1991. 633: p. 78-89.
  84. Jhiang, S.M., The RET proto-oncogene in human cancers. *Oncogene*, 2000. 19(49): p. 5590-7.
  85. Jing, S., et al., GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell*, 1996. 85(7): p. 1113-24.
  86. Jongen, J.L., et al., Depletion of GDNF from primary afferents in adult rat dorsal horn following peripheral axotomy. *Neuroreport*, 1999. 10(4): p. 867-71.
  87. Jorgensen, O.S. and E. Bock, Brain specific synaptosomal membrane proteins demonstrated by crossed immunoelectrophoresis. *J Neurochem*, 1974. 23(4): p. 879-80.
  88. Kane, L.P., et al., Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol*, 1999. 9(11): p. 601-4.
  89. Kaplan, D.R., et al., The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*, 1991. 252(5005): p. 554-8.
  90. Kawamoto, Y., et al., Identification of RET autophosphorylation sites by mass spectrometry. *J Biol Chem*, 2004. 279(14): p. 14213-24.
  91. Keller-Peck, C.R., et al., Glial cell line-derived neurotrophic factor administration in postnatal life results in motor unit enlargement and continuous synaptic remodeling at the neuromuscular junction. *J Neurosci*, 2001. 21(16): p. 6136-46.
  92. Kingham, P.J. and G. Terenghi, Bioengineered nerve regeneration and muscle reinnervation. *J Anat*, 2006. 209(4): p. 511-26.
  93. Kiryushko, D., et al., Neural cell adhesion molecule induces intracellular signaling via multiple mechanisms of Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Mol Biol Cell*, 2006. 17(5): p. 2278-86.
  94. Kokaia, Z., et al., GDNF family ligands and receptors are differentially regulated after brain insults in the rat. *Eur J Neurosci*, 1999. 11(4): p. 1202-16.
  95. Kordower, J.H., et al., Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science*, 2000. 290(5492): p. 767-73.
  96. Kotzbauer, P.T., et al., Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature*, 1996. 384(6608): p. 467-70.
  97. Lapchak, P.A., P.J. Miller, and S. Jiao, Glial cell line-derived neurotrophic factor induces the dopaminergic and cholinergic phenotype and increases locomotor activity in aged Fischer 344 rats. *Neuroscience*, 1997. 77(3): p. 745-52.
  98. Latasa, M.J., et al., Retinoic acid regulates myelin formation in the peripheral nervous system. *Glia*, 2010. 58(12): p. 1451-64.
  99. Leibrock, J., et al., Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature*, 1989. 341(6238): p. 149-52.
  100. Li, Y., et al., Neuregulin signaling through a PI3K/Akt/Bad pathway in Schwann cell survival. *Mol Cell Neurosci*, 2001. 17(4): p. 761-7.

## BIBLIOGRAFÍA

101. Lin, L.F., et al., GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 1993. 260(5111): p. 1130-2.
102. Lindahl, M., et al., Expression and alternative splicing of mouse Gfra4 suggest roles in endocrine cell development. *Mol Cell Neurosci*, 2000. 15(6): p. 522-33.
103. Liu, X., et al., Oncogenic RET receptors display different autophosphorylation sites and substrate binding specificities. *J Biol Chem*, 1996. 271(10): p. 5309-12.
104. Loers, G., et al., Signal transduction pathways implicated in neural recognition molecule L1 triggered neuroprotection and neuritogenesis. *J Neurochem*, 2005. 92(6): p. 1463-76.
105. Luo, J.L., H. Kamata, and M. Karin, The anti-death machinery in IKK/NF-kappaB signaling. *J Clin Immunol*, 2005. 25(6): p. 541-50.
106. Lupski, J.R. and C.A. Garcia, Molecular genetics and neuropathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain Pathol*, 1992. 2(4): p. 337-49.
107. Maden, M., Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 2007. 8(10): p. 755-65.
108. Manie, S., et al., The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation. *Trends Genet*, 2001. 17(10): p. 580-9.
109. Meintanis, S., et al., The neuron-glia signal beta-neuregulin promotes Schwann cell motility via the MAPK pathway. *Glia*, 2001. 34(1): p. 39-51.
110. Milbrandt, J., et al., Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron*, 1998. 20(2): p. 245-53.
111. Mogha, A., et al., Gpr126 functions in Schwann cells to control differentiation and myelination via G-protein activation. *J Neurosci*, 2013. 33(46): p. 17976-85.
112. Moore, M.W., et al., Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature*, 1996. 382(6586): p. 76-9.
113. Muller, U. and R. Kypta, Molecular genetics of neuronal adhesion. *Curr Opin Neurobiol*, 1995. 5(1): p. 36-41.
114. Nanobashvili, A., et al., Development and persistence of kindling epilepsy are impaired in mice lacking glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(22): p. 12312-7.
115. Nave, K.A. and J.L. Salzer, Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol*, 2006. 16(5): p. 492-500.
116. Naveilhan, P., et al., Expression and regulation of GFRalpha3, a glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(3): p. 1295-300.
117. Ng, B.K., et al., Anterograde transport and secretion of brain-derived neurotrophic factor along sensory axons promote Schwann cell myelination. *J Neurosci*, 2007. 27(28): p. 7597-603.
118. Nicole, O., et al., Neuroprotection mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor: involvement of a reduction of NMDA-induced calcium influx by the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci*, 2001. 21(9): p. 3024-33.

119. Nishino, J., et al., GFR alpha3, a component of the artemin receptor, is required for migration and survival of the superior cervical ganglion. *Neuron*, 1999. 23(4): p. 725-36.
120. Noble, M., et al., Glial cells express N-CAM/D2-CAM-like polypeptides in vitro. *Nature*, 1985. 316(6030): p. 725-8.
121. Nosrat, C.A., et al., Cellular expression of GDNF mRNA suggests multiple functions inside and outside the nervous system. *Cell Tissue Res*, 1996. 286(2): p. 191-207.
122. Oppenheim, R.W., et al., Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature*, 1995. 373(6512): p. 344-6.
123. Oppenheim, R.W., et al., Glial cell line-derived neurotrophic factor and developing mammalian motoneurons: regulation of programmed cell death among motoneuron subtypes. *J Neurosci*, 2000. 20(13): p. 5001-11.
124. Paoloni-Giacobino, A., H. Chen, and S.E. Antonarakis, Cloning of a novel human neural cell adhesion molecule gene (NCAM2) that maps to chromosome region 21q21 and is potentially involved in Down syndrome. *Genomics*, 1997. 43(1): p. 43-51.
125. Paratcha, G., et al., Released GFRalpha1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts. *Neuron*, 2001. 29(1): p. 171-84.
126. Paratcha, G., F. Ledda, and C.F. Ibáñez, The Neural Cell Adhesion Molecule NCAM Is an Alternative Signaling Receptor for GDNF Family Ligands. *Cell*, 2003. 113(7): p. 867-879.
127. Pereira, J.A., F. Lebrun-Julien, and U. Suter, Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. *Trends Neurosci*, 2012. 35(2): p. 123-34.
128. Pereira, L.A., et al., *Pdgfralpha* and *Flk1* are direct target genes of *Mixl1* in differentiating embryonic stem cells. *Stem Cell Res*, 2012. 8(2): p. 165-79.
129. Pezeshki, G., B. Franke, and J. Engele, Evidence for a ligand-specific signaling through GFRalpha-1, but not GFRalpha-2, in the absence of Ret. *J Neurosci Res*, 2001. 66(3): p. 390-5.
130. Piirsoo, M., et al., Expression of NGF and GDNF family members and their receptors during peripheral nerve development and differentiation of Schwann cells in vitro. *Neurosci Lett*, 2010. 469(1): p. 135-40.
131. Polanska, U.M., D.G. Fernig, and T. Kinnunen, Extracellular interactome of the FGF receptor-ligand system: complexities and the relative simplicity of the worm. *Dev Dyn*, 2009. 238(2): p. 277-93.
132. Poteryaev, D., et al., GDNF triggers a novel ret-independent Src kinase family-coupled signaling via a GPI-linked GDNF receptor alpha1. *FEBS Lett*, 1999. 463(1-2): p. 63-6.
133. Povlsen, G.K., V. Berezin, and E. Bock, Neural cell adhesion molecule-180-mediated homophilic binding induces epidermal growth factor receptor (EGFR) down-regulation and uncouples the inhibitory function of EGFR in neurite outgrowth. *J Neurochem*, 2008. 104(3): p. 624-39.



## BIBLIOGRAFÍA

134. Pralle, A., et al., Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol*, 2000. 148(5): p. 997-1008.
135. Raabe, T.D., et al., Cultured neonatal Schwann cells contain and secrete neuregulins. *J Neurosci Res*, 1996. 46(2): p. 263-70.
136. Raabe, T.D., et al., Localization of neuregulin isoforms and erbB receptors in myelinating glial cells. *Glia*, 2004. 45(2): p. 197-207.
137. Rajan, N., et al., Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nat Protoc*, 2006. 1(6): p. 2753-8.
138. Ridley, A.J., et al., Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 2003. 302(5651): p. 1704-9.
139. Rizzi, E., et al., Synthesis and RET protein kinase inhibitory activity of 3-arylureidobenzylidene-indolin-2-ones. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007. 17(14): p. 3962-8.
140. Romashkova, J.A. and S.S. Makarov, NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*, 1999. 401(6748): p. 86-90.
141. Rosenbaum, C., et al., Schwann cells express NDF and SMDF/n-ARIA mRNAs, secrete neuregulin, and show constitutive activation of erbB3 receptors: evidence for a neuregulin autocrine loop. *Exp Neurol*, 1997. 148(2): p. 604-15.
142. Rossi, J., et al., Parasympathetic innervation and function of endocrine pancreas requires the glial cell line-derived factor family receptor alpha2 (GFRalpha2). *Diabetes*, 2005. 54(5): p. 1324-30.
143. Rossi, J., et al., Distinct roles for GFRalpha1 and GFRalpha2 signalling in different cranial parasympathetic ganglia in vivo. *Eur J Neurosci*, 2000. 12(11): p. 3944-52.
144. Saarma, M. and H. Sariola, Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Microsc Res Tech*, 1999. 45(4-5): p. 292-302.
145. Salvatore, D., et al., Tyrosines 1015 and 1062 are in vivo autophosphorylation sites in ret and ret-derived oncoproteins. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. 85(10): p. 3898-907.
146. Sanchez, M.P., et al., Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature*, 1996. 382(6586): p. 70-3.
147. Sariola, H. and M. Saarma, GDNF and its receptors in the regulation of the ureteric branching. *Int J Dev Biol*, 1999. 43(5): p. 413-8.
148. Sariola, H. and M. Saarma, Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci*, 2003. 116(Pt 19): p. 3855-62.
149. Schaar, D.G., et al., Regional and cell-specific expression of GDNF in rat brain. *Exp Neurol*, 1993. 124(2): p. 368-71.
150. Schmid, R.S. and P.F. Maness, L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth. *Curr Opin Neurobiol*, 2008. 18(3): p. 245-50.

151. Schuetz, G., et al., The neuronal scaffold protein Shank3 mediates signaling and biological function of the receptor tyrosine kinase Ret in epithelial cells. *J Cell Biol*, 2004. 167(5): p. 945-52.
152. Seidenfaden, R., A. Krauter, and H. Hildebrandt, The neural cell adhesion molecule NCAM regulates neuritogenesis by multiple mechanisms of interaction. *Neurochem Int*, 2006. 49(1): p. 1-11.
153. Seidenfaden, R., et al., Polysialic acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic neural cell adhesion molecule interactions. *Mol Cell Biol*, 2003. 23(16): p. 5908-18.
154. Semba, J., et al., Alterations in the expressions of mRNA for GDNF and its receptors in the ventral midbrain of rats exposed to subchronic phencyclidine. *Brain Res Mol Brain Res*, 2004. 124(1): p. 88-95.
155. Shaw, R.J. and L.C. Cantley, Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*, 2006. 441(7092): p. 424-30.
156. Snider, W.D. and S.B. McMahon, Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron*, 1998. 20(4): p. 629-32.
157. Stromberg, I., et al., Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in the developing but not adult striatum and stimulates developing dopamine neurons in vivo. *Exp Neurol*, 1993. 124(2): p. 401-12.
158. Svaren, J. and D. Meijer, The molecular machinery of myelin gene transcription in Schwann cells. *Glia*, 2008. 56(14): p. 1541-51.
159. Syroid, D.E., et al., Cell death in the Schwann cell lineage and its regulation by neuregulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(17): p. 9229-34.
160. Takahashi, M., The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2001. 12(4): p. 361-73.
161. Takahashi, M., J. Ritz, and G.M. Cooper, Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell*, 1985. 42(2): p. 581-8.
162. Taraviras, S., et al., Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. *Development*, 1999. 126(12): p. 2785-97.
163. Todaro, L., et al., Neural cell adhesion molecule in human serum. Increased levels in dementia of the Alzheimer type. *Neurobiol Dis*, 2004. 15(2): p. 387-93.
164. Tolwani, R.J., et al., BDNF overexpression increases dendrite complexity in hippocampal dentate gyrus. *Neuroscience*, 2002. 114(3): p. 795-805.
165. Tomac, A., et al., Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature*, 1995. 373(6512): p. 335-9.
166. Treanor, J.J., et al., Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature*, 1996. 382(6586): p. 80-3.
167. Troppmair, J., et al., Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated

## BIBLIOGRAFÍA

- protein kinase activation by oncogenes, serum, and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate requires Raf and is necessary for transformation. *J Biol Chem*, 1994. 269(9): p. 7030-5.
168. Trupp, M., et al., Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor-alpha indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. *J Neurosci*, 1997. 17(10): p. 3554-67.
169. Trupp, M., et al., Multiple GPI-anchored receptors control GDNF-dependent and independent activation of the c-Ret receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Neurosci*, 1998. 11(1-2): p. 47-63.
170. Uesaka, T., et al., Conditional ablation of GFRalpha1 in postmigratory enteric neurons triggers unconventional neuronal death in the colon and causes a Hirschsprung's disease phenotype. *Development*, 2007. 134(11): p. 2171-81.
171. Van Haastert, P.J. and P.N. Devreotes, Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. 5(8): p. 626-34.
172. Vawter, M.P., Dysregulation of the neural cell adhesion molecule and neuropsychiatric disorders. *Eur J Pharmacol*, 2000. 405(1-3): p. 385-95.
173. Vutskits, L., et al., PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons. *Eur J Neurosci*, 2001. 13(7): p. 1391-402.
174. Williams, E.J., et al., A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase inhibitor, KN-62, inhibits neurite outgrowth stimulated by CAMs and FGF. *Mol Cell Neurosci*, 1995. 6(1): p. 69-79.
175. Wong, A., et al., FRS2 alpha attenuates FGF receptor signaling by Grb2-mediated recruitment of the ubiquitin ligase Cbl. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(10): p. 6684-9.
176. Wullschleger, S., R. Loewith, and M.N. Hall, TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 2006. 124(3): p. 471-84.
177. Xiao, Q., et al., The roles of signaling pathways in regulating kidney development. *Yi Chuan*, 2015. 37(1): p. 1-7.
178. Xing, S., et al., Signal transduction pathways activated by RET oncoproteins in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem*, 1998. 273(9): p. 4909-14.
179. Yan, Q., C. Matheson, and O.T. Lopez, In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. *Nature*, 1995. 373(6512): p. 341-4.
180. Yang, J., et al., PSPN/GFRalpha4 has a significantly weaker capacity than GDNF/GFRalpha1 to recruit RET to rafts, but promotes neuronal survival and neurite outgrowth. *FEBS Lett*, 2004. 569(1-3): p. 267-71.
181. Yoon, C., Z. Korade, and B.D. Carter, Protein kinase A-induced phosphorylation of the p65 subunit of nuclear factor-kappaB promotes Schwann cell differentiation into a myelinating phenotype. *J Neurosci*, 2008. 28(14): p. 3738-46.
182. Yu, T., et al., Expression of GDNF family receptor components during development: implications in the mechanisms of interaction. *J Neurosci*, 1998. 18(12): p. 4684-96.

183. Yuki, N. and H.P. Hartung, Guillain-Barre syndrome. *N Engl J Med*, 2012. 366(24): p. 2294-304.
184. Zhang, F., et al., Compositional analysis of heparin/heparan sulfate interacting with fibroblast growth factor.fibroblast growth factor receptor complexes. *Biochemistry*, 2009. 48(35): p. 8379-86.
185. Zhang, H., et al., A role for the polysialic acid-neural cell adhesion molecule in PDGF-induced chemotaxis of oligodendrocyte precursor cells. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 1): p. 93-103.
186. Zhang, L., et al., GDNF-enhanced axonal regeneration and myelination following spinal cord injury is mediated by primary effects on neurons. *Glia*, 2009.
187. Zheng, J.Q., et al., Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. *Nature*, 1994. 368(6467): p. 140-4.
188. Zhou, F.Q., J. Zhong, and W.D. Snider, Extracellular crosstalk: when GDNF meets N-CAM. *Cell*, 2003. 113(7): p. 814-5.
189. Zihlmann, K.B., et al., The GDNF family members neurturin, artemin and persephin promote the morphological differentiation of cultured ventral mesencephalic dopaminergic neurons. *Brain Res Bull*, 2005. 68(1-2): p. 42-53.
190. Zurn, A.D., et al., Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a new neurotrophic factor for motoneurons. *Neuroreport*, 1994. 6(1): p. 113-8.
191. Zwick, M., et al., Overexpression of GDNF induces and maintains hyperinnervation of muscle fibers and multiple end-plate formation. *Exp Neurol*, 2001. 171(2): p. 342-50.